

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ANDRÉA DULOR FINKLER**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ADOÇÃO SOBRE A RELAÇÃO MÃE-  
FILHOTE NO INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM RATOS**

**Porto Alegre**

**2019**

**ANDRÉA DULOR FINKLER**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ADOÇÃO SOBRE A RELAÇÃO MÃE-  
FILHOTE NO INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós –  
Graduação em Neurociências do Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutora em Neurociências.  
Linha de Pesquisa: Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre

2019

**ANDRÉA DULOR FINKLER**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ADOÇÃO SOBRE A RELAÇÃO MÃE-FILHOTE NO INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Aprovada em 17 de junho de 2019.

---

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion  
Orientador  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Giovenardi  
Membro Externo  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

---

Prof. Dr. Fernando Benetti  
Membro Externo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria de Almeida  
Membro Interno (Relatora)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*“Assim como acontece em ratos, seres humanos carregam por toda a vida marcas permanentes do que os entes queridos lhes fazem ou deixam de fazer”.*

*Mc Gown*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Aldo Bolten Lucion, pela oportunidade de orientação deste trabalho, pela paciência, compreensão e pelos ensinamentos necessários para o desenvolvimento desta tese.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências que me acolheram e permitiram meu crescimento oferecendo ensino de qualidade e suporte durante a minha trajetória.

A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

À minha colega e grande amiga Grace Espinoza Pardo, pelo apoio técnico e emocional durante todos esses anos de Doutorado. Não tenho dúvida que sem você eu não teria conseguido! Também sou grata por teres me proporcionado um olhar diferenciado para a ciência.

À Thaís Barros, obrigada pelo apoio na reta final dos experimentos e pela sua adorável amizade.

À Clarissa Bellagamba, Izabela Espíndula, Bruna de Oliveira pelo apoio durante os experimentos e pelos ótimos seminários que tivemos.

Aos meus pais, que sempre me guiaram no caminho da Educação e do Trabalho. Sou muito feliz por isso!

Também, um agradecimento especial à minha filha Gabriela, a quem dedico este trabalho, que embora pequena em idade foi grande em pensamento, sabendo apoiar e compreender as minhas dificuldades e principalmente as minhas ausências. E ao meu marido Nagel, cujo apoio, incentivo e parceria foram fundamentais! Nos momentos mais difíceis, que não foram poucos nestes últimos anos, vocês me fizeram acreditar que eu chegaria ao final desta difícil trajetória. Obrigada meus AMORES!!!

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta Tese.

Meu muito obrigada!!

## RESUMO

As experiências da criança vividas com a sua mãe ou com seu cuidador no início da vida fornecem o modelo básico para as relações sócio afetivas na vida adulta. Dentro desta perspectiva, uma série de situações ocorridas nos primeiros anos de vida podem comprometer o desenvolvimento saudável do indivíduo. As crianças institucionalizadas, apesar de receberem cuidados adequados, apresentam importantes mudanças comportamentais na vida adulta, as quais, tem sido fortemente associada à falta de um vínculo com a figura materna no início da vida. Atualmente, ainda não se sabe como os processos de adoção humana alteram a relação mãe-bebê no início da vida. Dentro desta perspectiva, a racionalidade desta tese foi representar a complexa situação da adoção humana através de um modelo animal com o propósito de explorar o seu impacto na formação do vínculo (apego) do filho com um cuidador e, assim, contribuir com o entendimento dos processos que envolvem a adoção infantil, uma situação bastante frequente, mas pouco abordada experimentalmente. Para isso foram utilizados um total de 804 ratos Wistars (88 fêmeas prenhas, 12 machos e 704 filhotes). Inicialmente, caracterizamos o perfil comportamental dos filhotes em diferentes períodos pós-natais e o padrão de comportamento materno de ratos Wistar, no mesmo ambiente em que, posteriormente estudamos os efeitos da adoção. Posteriormente, avaliamos os efeitos comportamentais da adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes (RCF) sobre a formação do vínculo mãe-filhote em dois períodos importantes do desenvolvimento pós-natal: no período sensível a aprendizagem do apego (dias pós-natal 1 a 3) e no período pós-sensível a aprendizagem de apego (dias pós-natal 9 a 11), tanto na perspectiva da mãe adotiva quanto na perspectiva dos filhotes adotivos. O protocolo de RCF realizado precocemente (dias pós-natal 1 a 3) reduziu a capacidade dos filhotes de preferir o odor da figura materna – filhotes machos RCF [Mdn: 0 (0-0)] vs. filhotes machos controles [Mdn: 25,67 (3,33-33,58)] e filhotes fêmeas RCF [Mdn: 0 (0-2,75)] vs. filhotes fêmeas controles [Mdn 14,17 (9,5-26,58)]. Entretanto, a adoção realizada tardiamente (dias pós-natal 9 a 11) não alterou significativamente a capacidade dos filhotes de preferirem o odor materno – filhotes machos RCF ( $32,53 \pm 4,14$ ) vs. filhotes controles ( $36,12 \pm 3,84$ ); e filhotes fêmeas RCF ( $37,11 \pm 5,28$ ) vs. filhotes controle ( $31,03 \pm 5,72$ ). Além disso, a adoção precoce reduziu o cuidado materno no dia DPN 2 – mães RCF ( $25,67 \pm 3,50$ ) vs. mães controles ( $53,75 \pm 2,34$ ); e no dia DPN 3 mães RCF ( $21,83 \pm 2,91$ ) vs. mães controles ( $37,17 \pm 2,10$ ). A adoção precoce também reduziu a motivação materna para recolher os filhotes e levá-los para o ninho – tempo para recolhimento do *primeiro filhote*: mães RCF [Mdn 39 (18-89,75)] vs. mães controles [Mdn 16 (8,25-28,50)]; e *quinto filhote*: mães RCF [Mdn 167 (79-410,5)] vs. mães controles [Mdn. 86,5 (61,75-160,3)]. A adoção tardia reduziu o cuidado materno no dia DPN 9 em relação as mães do grupo controle - mães RCF ( $23,33 \pm 2,49$ ) vs mães controle ( $37,17 \pm 5,21$ ). Esse estudo forneceu evidências de que o RCF, realizado durante o período sensível a aprendizagem do apego infantil (adoção precoce), criou um ambiente instável para o estabelecimento da interação mãe-filhote e, como resultado, reduziu significativamente o comportamento materno e diminuiu as respostas dos filhotes ao odor materno. Por outro lado, o procedimento de RCF realizado durante o período pós- sensível a aprendizagem do apego (adoção tardia) reduziu ligeiramente o cuidado materno, porém não alterou as respostas comportamentais dos filhotes ao odor materno.

**Palavras-chave:** Comportamento de apego; Aprendizado; Preferência olfatória; Comportamento materno; Mães adotivas; Comportamento de evitação; Desenvolvimento

## ABSTRACT

Child experiences with their mother or caregiver early in life provide the basic model for socio-affective relationships in adult life. Within this perspective, a series of situations which have happened in the first years of life can compromise a healthy development of the individual. Institutionalized children, despite receiving adequate care, exhibit important behavioral changes in adult life, which have been strongly associated with lack of attachment to the maternal figure in early life. It is not yet known how the processes of human adoption change the mother-infant relationship early in life. In this perspective, the rationale of this thesis was to represent the complex situation of human adoption through an animal model in order to explore its impact in the formation of the offspring's attachment to a caregiver and, thus, contribute to the understanding of the processes that involve child adoption, a situation that is quite frequent but little discussed experimentally. A total of 804 Wistar rats (88 pregnant females, 12 males and 704 pups) were used. Initially, we characterized the behavioral profile of postnatal pups and the pattern of maternal behavior of Wistar rats, in the same environment where the effects of adoption were later studied. We evaluated the behavioral effects of repeated cross-fostering of lactating females (RCF) on the formation of the mother-infant bond in two important periods of postnatal development: in the sensitive period of attachment learning (postnatal days (PND) 1 to 3) and in the post-sensitive period of attachment learning (postnatal days 9 to 11), both from the perspective of the adoptive mother and from the perspective of the adopted pups. The RCF protocol performed early (PND 1 to 3) reduced the pups' ability to prefer the maternal odor – RCF male pups RCF [Mdn: 0 (0-0)] vs. control male pups [Mdn: 25,67 (3,33-33,58)]; and RCF female pups [Mdn: 0 (0-2,75)] vs. control female pups [Mdn: 14,17 (9,5-26,58)]. However, late adoption (PND 9 to 11) did not affect the pups' ability to prefer maternal odor – RCF male pups (32,53  $\pm$  4,14) vs. control male pups (36,12  $\pm$  3,84) and RCF female pups (37,11  $\pm$  5,28) vs. control female pups (31,03  $\pm$  5,72). Moreover, early adoption reduced maternal care on PND 2 – RCF mothers (25,67  $\pm$  3,50) vs. control mothers (53,75  $\pm$  2,34); and on PND 3 – RCF mothers (21,83  $\pm$  2,91) vs. control mothers (37,17  $\pm$  2,10). Early adoption reduced motivation in pups retrieval test – time for *first pup*: RCF mothers [Mdn 39 (18-89,75)] vs. control mothers [Mdn 16 (8,25-28,50)]; and *fifth pup*: RCF mothers [Mdn 167 (79-410,5)] vs. control mothers [Mdn. 86,5 (61,75-160,3)]. On the other hand, late adoption reduced maternal care on PND 9 – RCF mothers (23,33  $\pm$  2,49) vs. control mothers (37,17  $\pm$  5,21). This study provided evidence that RCF performed during the sensitive period of infant attachment learning (early adoption) developed an unstable environment for mother-infant interaction to occur in a healthy and adequate way and, as a result, significantly reduced maternal behavior and pups' response to maternal odor. On the other hand, the RCF procedure performed after the attachment learning period (late adoption) slightly reduced maternal care and it did not alter the behavioral responses of the pups to the maternal odor.

**Key-Words:** Attachment behavior; Learning; Olfactory preference; Maternal behavior; Adoptive mothers; Avoidance behavior; Developmental

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

### **ARTIGO I**

Figure 1: Representation of the experimental design.

Figure 2: Olfactory preference profile to own nest odor and juvenile rats' odor during early development.

Figure 3: Profile of behavioral responses to adult male nest odor and sand with cat urine odor (predator odor) during early life.

Figure 4: Naturally occurring variations in maternal behavior at PPD 2, 6, 10, and 14.

Box 1: Olfactory behavioral responses to own nest odor, juvenile rat nest odor, adult male rat nest odor or sand with cat urine (predator odor) in male and female infant rats on PND 3, 7, 11, and 15.

### **ARTIGO II**

Figure 1. Design of the cross-fostering experiment.

Figure 2. Effects of early repeated cross-fostering on nursing behavior and maternal motivation

Figure 3. Effect of early repeated cross-fostering on the olfactory preference to home bedding odor on postnatal day 7 and nipple attachment on postnatal day 8

Figure 4. Effects of late repeated cross-fostering on nursing behavior

Figure 5. Late cross-fostering has no effects on olfactory preference on home bedding on postnatal day 15 or on nipple attachment on postnatal day 16.



## **LISTA DE TABELA**

### **ARTIGO I**

Table 1: Olfactory behavioral responses to own nest odor or juvenile rat nest odor versus clean shavings in male and female infant rats on PND 3, 7, 11, and 15

Table 2: Olfactory behavioral responses to adult male rat nest odor or sand with cat urine (predator odor) versus clean shavings in male and female infant rats on PND 3, 7, 11, and 15

Table 3: Comparison of male and female pup olfactory behavioral responses on PND 3, 7, 11, and 15 to biological relevant odors.

Table 4: Cumulative maternal behavior of the four daily observations during postpartum period day 2, 6, 10, and 14.

Table 5: Differences in maternal behavior during the 4 periods of observation in postpartum day 2, 6, 10, and 14.

### **ARTIGO II**

Table 1: Effects of the early RCF procedure on the total nursing behavior score (sum of nursing behaviors) during 4 periods per day.

Table 2. Cumulative maternal behavior during the early RCF procedure period (PND 1- PND 3) and during the first six postpartum days (PND 1 – PND 6).

Table 3: Olfactory behavioral responses to biologically relevant odors in male and female pups on PND 7 and PND 15 that experienced early or late cross-fostering procedure.

Table 4. Effects of late RCF procedure on the total nursing behavior (sum of nursing behaviors) during 4 periods of day

Table 5: Cumulative maternal behavior during the late RCF procedure period (PND 9- PND 11) and during PND 9 to 14.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Em Português

RCF – Adoção Cruzada Repetida de Fêmeas Lactantes

DPN – Dia Pós-Natal

DPP – Dia Pós-Parto

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

IQ – Dados expressados como mediana

ANOVA – Análise de Variância

CT – Grupo Controle

SEM – Erro padrão da média

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

### Em Inglês

PND – *Postnatal Days*

PPD – *Postpartum Days*

GD - *Gestational Day*

NIH – *National Institutes of Health*

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	5
<b>RESUMO</b>	6
<b>ABSTRACT</b>	7
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	8
<b>ARTIGO I</b>	8
<b>ARTIGO II</b>	8
<b>LISTA DE TABELA</b>	9
<b>ARTIGO I</b>	9
<b>ARTIGO II</b>	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	10
<b>CAPÍTULO I</b>	15
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1.1 Adoção	15
1.1.2 Apego mãe – filho	17
1.1.3 Apego mãe-filhote em roedores	18
1.2 MOTIVAÇÃO DO ESTUDO	20
1.3 PRINCIPAIS PERGUNTAS DE PESQUISA	20
1.4 HIPÓTESES ESPECÍFICAS	21
1.5 ESTRUTURA DA TESE	22
<b>2 OBJETIVO GERAL</b>	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>CAPÍTULO II</b>	25
<b>DEVELOPMENT OF BEHAVIORAL RESPONSES TO BIOLOGICALLY RELEVANT ODORS IN INFANT RATS</b>	25
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b>	25
<b>ABSTRACT</b>	25
<b>1 INTRODUCTION</b>	26
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b>	28
2.1 ANIMALS AND ETHICS STATEMENT	28
2.2 BEHAVIORAL STUDIES	30
2.2.1 Olfactory Preference Test	30
2.2.2 Maternal Behavior	31
2.3 STATISTICAL ANALYSIS	32

<b>3. RESULTS</b>	32
3.1 DEVELOPMENT OF OLFACTORY PREFERENCE BEHAVIORAL RESPONSES TO OWN NEST ODOR	32
3.2 DEVELOPMENT OF OLFACTORY PREFERENCE BEHAVIORAL RESPONSES TO JUVENILE RAT NEST ODOR	34
3.3 DEVELOPMENT OF OLFACTORY AVERSIVE BEHAVIORAL RESPONSES TO PREDATOR ODORS	36
3.3.1 Development of olfactory aversive behavioral responses to adult rat nest odor	36
3.3.2 Development of olfactory aversive behavioral responses to cat urine odor	38
3.4 NATURAL VARIATION OF THE MATERNAL BEHAVIOR	40
<b>4. DISCUSSION</b>	43
4.1 THE BEHAVIORAL PREFERENCE TO OWN NEST DEVELOPS ALONG WITH IMPORTANT VARIATIONS IN MATERNAL BEHAVIORS	44
4.2 DEVELOPMENT OF OLFACTORY PREFERENCE TO THE JUVENILE RAT NEST ODOR	46
4.3 DEVELOPMENT OF BEHAVIORAL RESPONSE TO ODOR AVOIDANCE OF ADULT MALE RATS NEST ODOR	47
4.4 DEVELOPMENT OF BEHAVIORAL AVOIDANCE RESPONSE TO PREDATOR ODOR	48
<b>5 FINAL CONSIDERATIONS</b>	49
<b>6 REFERENCES</b>	50
<b>CAPÍTULO III</b>	54
<b>ARTIGO II – Este artigo foi enviado para a revista “<i>Developmental Psychobiology</i>”, conforme comprovante no Anexo B.</b>	54
<b>REPEATED CROSS-FOSTERING AFFECTS MATERNAL BEHAVIOR AND OLFACTORY PREFERENCES IN RAT PUPS</b>	54
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b>	54
<b>ABSTRACT</b>	55
<b>1 INTRODUCTION</b>	55
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b>	57
2.1 SUBJECTS AND HOUSING CONDITIONS	57
2.2 RCF MODEL	58
2.3 BEHAVIORAL PROCEDURES	59
2.3.1 Maternal behavior	59
2.3.2 Pup-retrieval test	60
2.3.3 Olfactory preference test	61
2.3.4 Nipple attachment test	62
2.4 BODY WEIGHT GAIN OF PUPS	63
2.5 STATISTICAL ANALYSIS	63
<b>3 RESULTS</b>	63

3.1 EFFECT OF EARLY RCF ON MATERNAL BEHAVIOR OF LACTATING FEMALES.....	63
3.2 NURSING BEHAVIOR .....	63
3.2.1 Pup retrieval .....	66
3.3 EFFECT OF EARLY RCF ON THE OLFACTORY PREFERENCE OF RAT PUPS ON POSTNATAL DAY 7 .....	67
3.3.1 Biological or adoptive mother nest bedding vs clean bedding .....	67
3.3.2 GD 20 Biological mother nest-odor vs clean bedding .....	68
3.3.3 Predator odor vs clean bedding .....	70
3.3.4 Effect of early RCF on nipple attachment behavior of pups at PND 8 .....	70
3.4 EFFECT OF EARLY RCF ON PUPS' WEIGHT GAIN .....	71
3.5 EFFECT OF LATE RCF ON THE MATERNAL BEHAVIOR OF LACTATING FEMALES	72
3.5.1 Nursing behavior .....	72
3.6 EFFECT OF LATE RCF ON THE OLFACTORY PREFERENCE OF PUPS FROM RATS AT PND 15.....	75
3.6.1 Biological or adoptive mother nest-odor vs clean bedding.....	75
3.6.2 GD 20 Biological mother nest-odor vs clean bedding. ....	76
3.6.3 Predator odor vs clean bedding .....	77
3.6.4 Effect of late RCF on nipple attachment of rat pups.....	77
<b>4 DISCUSSION</b> .....	78
4.1 EFFECTS OF RCF ON MATERNAL CARE AND MATERNAL MOTIVATION .....	78
4.2 EARLY RCF ALTERS OLFACTORY BEHAVIOR RESPONSE TO THE HOME-NEST ODOR	81
4.3 LATE RCF DOES NOT ALTER THE OLFACTORY BEHAVIOR RESPONSE TO THE HOME-NEST ODOR .....	84
4.4 RCF PERFORMED DURING THE ATTACHMENT SENSITIVE AND POSTSENSITIVE PERIODS DOES NOT ALTER AVOIDANCE BEHAVIOR TOWARD BIOLOGICALLY AVERSIVE ODORS .....	85
<b>5 REFERENCES</b> .....	86
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	89
<b>4. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	89
4.1 EFEITOS DO RCF PRECOCE SOBRE O CUIDADO E A MOTIVAÇÃO MATERNA.....	91
4.2 EFEITOS DO RCF PRECOCE SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS FILHOTES ....	94
4.2.1 Preferência olfatória para o odor materno .....	94
4.2.2 Preferência Olfatória / evitação para o odor de predador .....	96
4.3 Efeitos do RCF tardio sobre o cuidado materno .....	97
4.4 EFEITOS DO RCF TARDIO SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS FILHOTES .....	99
4.4.1 Preferência olfatória para o odor materno .....	99
4.4.2 Preferência Olfatória / evitação para o odor de predador .....	100
4.5 RELAÇÃO COM ESTUDOS EM HUMANOS .....	101

<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO D .....</b>	<b>116</b>

## **CAPÍTULO I**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

O presente estudo elucidou alguns efeitos comportamentais da adoção, realizada no início do desenvolvimento pós-natal, em um modelo animal que buscou mimetizar a instabilidade ambiental, a qual crianças entregues para adoção normalmente estão expostas. Neste capítulo, apresentamos um referencial teórico, a motivação para a realização deste trabalho, as perguntas a serem respondidas, as hipóteses de pesquisa, a justificativa, os objetivos gerais e específicos do estudo, e, por fim, a estrutura geral desta tese.

#### **1.1 REFERENCIAL TEÓRICO**

##### **1.1.1 Adoção**

Crianças entregues para adoção geralmente vivenciam situações avassaladoras e, se essas experiências iniciais forem experimentadas através de maus-tratos, negligência da família biológica ou das instituições de abrigo, elas poderão apresentar muitas dificuldades em formar vínculos afetivos com seus novos pais adotivos. Da mesma forma, isso também pode acontecer em crianças que passaram muito tempo em instituições de acolhimento, apesar de terem recebido cuidados físicos adequados.

Um aspecto importante a ser levado em consideração, é que as experiências iniciais da criança com a sua mãe ou cuidador fornecem o modelo básico para as relações sócio afetivas na vida adulta (Moriceau et al., 2010; Sullivan et al., 2015). Dentro desta perspectiva, uma série de situações ocorridas nos primeiros anos de vida podem comprometer o desenvolvimento saudável do indivíduo. Estudos mostraram que um ambiente precoce afetivo, bem estruturado e com cuidados maternos estáveis, refletiram em padrões comportamentais estáveis na criança e

produziram sentimentos de segurança e confiança. Entretanto, ambientes caracterizados por mudanças significativas, instabilidade, falta de afeto e de segurança desencadearam comportamentos menos estáveis, sentimento de insegurança e falta de confiança (Lebovici, 1987).

Nas instituições de acolhimento, nem sempre os cuidadores conseguem suprir a necessidade afetiva e psicológica das crianças em função do elevado número de residentes. Assim, essa é uma variável importante que pode influenciar na formação de laços afetivos entre a criança e seus pais adotivos. Diversos estudos envolvendo crianças adotadas ou em acolhimento adotivo relataram uma melhora rápida após a colocação da família substituta, nos parâmetros físicos da criança - peso, altura e circunferência craniana - juntamente com uma recuperação social-emocional impressionante, embora incompleta (Juffer & Van IJzendoorn, 2009; Palacios & Brodzinsky, 2010).

Tem sido demonstrado diferenças no desenvolvimento e na saúde mental entre crianças adotadas e não adotadas (Askeland et al., 2015; Askeland et al., 2017; Westermeyer et al., 2015; Westermeyer et al., 2014). Além disso, o período em que a adoção ocorreu, se foi na fase inicial da vida ou na infância tardia, foi associado a um menor ou maior comprometimento respectivamente do desenvolvimento cognitivo e afetivo (Grotevant & McDermott, 2014). Também foi evidenciado que crianças adotadas podem ter maior tendência a apresentar comportamentos de risco ou comportamentos tipo suicida (Keyes et al., 2013), abuso de substâncias como álcool e drogas (Yoon et al., 2012) assim como respostas cognitivas inferiores quando comparadas a crianças não adotadas (Deltenserie & Genesee, 2014).

A institucionalização, embora possa ser melhor que as alternativas, como abandono ou maus-tratos em casa, proporciona um ambiente de cuidado inconsistente devido à rotatividade de cuidadores profissionais e a vários fatores desafiadores para o desenvolvimento de uma criança saudável que possivelmente prejudicam sua relação sócio emocional (Dozier & Rutter, 2016).

A adoção tem sido pouco estudada experimentalmente em modelos biológicos. Um modelo de adoção em animais, conhecido como adoção cruzada repetida (RCF) é um procedimento de rotina utilizado em muitos laboratórios com o objetivo de modelar a instabilidade ambiental precoce em humanos encontrada em muitas instituições de acolhimento (Cittaro et al., 2016; Luchetti et al., 2015). Este procedimento, consiste em entregar filhotes a uma fêmea lactante, diferente da mãe



biológica, geralmente dentro das primeiras 24 horas após o nascimento e repetir o mesmo procedimento todos os dias durante os primeiros 4 dias de vida do filhote, sendo que em cada dia os filhotes são entregues a uma fêmea lactante diferente (Luchetti et al., 2015). Essa imprevisibilidade no ambiente pós-natal inicial, provocada pelo protocolo do RCF, pode representar uma condição estressante para os filhotes que tem efeitos a longo prazo (Luchetti et al., 2015). É importante ressaltar que a estabilidade do ambiente neonatal, durante o período sensível ao aprendizado do apego pela figura materna (cuidador) é crucial para o desenvolvimento comportamental do filhote e para o estabelecimento do apego mãe-filhote.

### **1.1.2 Apego mãe – filho**

A Teoria do Apego evidencia a importância da ligação emocional que se desenvolve entre o bebê e seu “cuidador”, para orientar o desenvolvimento afetivo, cognitivo e social da criança. A partir de uma perspectiva etológica, (Bowlby, 1958, 1965, 1982) constatou que os bebês, assim como os pássaros, também apresentaram um “período sensível”, em que se encontram mais dispostos a formar vínculos com suas mães. Dessa maneira, eles revelaram esse vínculo (chamado apego) através do comportamentos como (sorrir, chorar, sugar o polegar, olhar em direção à mãe, buscar proximidade, contato físico) destinado a atrair a mãe para perto deles (recém-nascidos), ou levá-los (quando maiores) em direção a sua mãe.

Dizer que uma criança tem apego por alguém significa que ela está fortemente disposta a buscar proximidade e contato com uma figura específica, principalmente quando está cansada, assustada ou doente. Para isso, considerou-se o apego uma ligação contínua e íntima, apresentada pela criança em relação à mãe ou cuidador; enquanto o comportamento de apego foi considerado qualquer forma de comportamento que uma criança comumente adota para conseguir e/ou manter uma proximidade com algum outro indivíduo claramente identificado, por exemplo, a mãe. Assim, a característica essencial comum entre apego e comportamento de apego é que dois parceiros tendem a manter-se próximos um do outro (Klaus et al., 2000).

Um fator importante no comportamento de apego é a intensidade da emoção que o acompanha. Essa emoção surge conforme se desenvolve a relação entre o indivíduo apegado e a figura de apego. A partir dessas considerações Lebovici (1987),

reforçou que se tudo está bem na relação entre os indivíduos apegados, há satisfação e um senso de segurança; porém, se esta relação está ameaçada, existem ansiedade e angústia. Caso ocorra uma ruptura, há dor e depressão. No caso de privação materna, seja este afastamento físico ou emocional, muitas são as consequências, tanto de ordem física quanto intelectual e social, podendo, inclusive, desencadear o aparecimento de doenças físicas e mentais (Oppenheim et al., 2001).

Uma criança aprende sobre o mundo através do seu cuidador e, isso inclui a capacidade de experimentar o mundo por meio dos sinais de segurança e ameaça que o cuidador transmite. O apego no início da vida é um dos comportamentos sociais mais conservados nas espécies altriciais, incluindo os humanos, o qual se caracteriza por um repertório de comportamentos de procura-proximidade que o infante exibe com a mãe ou cuidador, principalmente durante o período de imaturidade sensorial e motora, os quais garantem que os filhotes permaneçam apegados a sua mãe ou ao seu cuidador, independente da qualidade de cuidado que possam receber (Moriceau, 2005; Sullivan, 2017).

### **1.1.3 Apego mãe-filhote em roedores**

Estudos em roedores mostraram que os filhotes de ratos possuem um repertório de respostas comportamentais específicas que os diferem das respostas observadas em animais adultos. É possível que tais especificidades tenham sido selecionadas ao longo da evolução por serem importantes para a manutenção do vínculo do filhote com a sua mãe (Opendak et al., 2017; Sullivan, 2017).

Ao estudar o desenvolvimento da aprendizagem infantil é importante entender que o cérebro do filhote de rato não é uma versão imatura do cérebro do adulto. Em vez disso é constituído para garantir que a aprendizagem do filhote mude para se adequar a cada época do desenvolvimento pós-natal, tipicamente usando “períodos sensíveis” temporários que filtram a aprendizagem, aprimorando alguns aspectos e inibindo outros (Sullivan, 2017).

Vários estudos mostraram, de maneira consistente, que o apego filhote-mãe se dá por um processo de aprendizado e formação de memória desta relação filial inicial (Sullivan & Wilson, 1991; Landers & Sullivan, 2012; Opendak & Sullivan, 2016). Tanto em humanos como em animais, o apego requer uma breve experiência de

aprendizado das características sensoriais da figura materna (odor, textura, cor e som), que se produz durante as primeiras interações do neonato com seu cuidador (Debiec & Sullivan, 2017; Rainecki et al., 2010; Sullivan & Holman, 2010).

Os filhotes altriciais recém-nascidos devem aprender o odor da sua mãe e usá-lo para orientar seus deslocamentos. Como a mãe é a única fonte de alimento, calor e proteção, aprender esse odor é fundamental para a sobrevivência do recém-nascido (Sullivan, 2003; Landers & Sullivan, 2012). Especificamente, o odor materno controla as interações dos filhotes de ratos com a mãe, incluindo respostas de aproximação, comportamento social e apego ao mamilo (Rainecki et al., 2010). O aprendizado olfatório é expresso e pode ser medido pela resposta de preferência do filhote pelo odor da mãe, através de comportamentos de orientação e aproximação da fonte deste odor. Ele ocorre numa janela temporal para sua formação, chamada nos roedores de período sensível ao apego. Em ratos, esse período corresponde aos primeiros 10 dias de vida. O aprendizado é fortemente dependente dos repertórios comportamentais que a mãe direciona para o filhote, e da responsividade do sistema nervoso do filhote para com os estímulos táteis maternos (Sullivan & Wilson, 2003).

Estudos mostraram que, o condicionamento realizado fora do ninho, ainda no período sensível ao apego, utilizando um odor artificial pareado com estímulos que mimetizam o cuidado materno, como por exemplo o comportamento de lamber o filhote, induz rapidamente uma resposta comportamental de preferência olfatória do filhote a esse odor que foi condicionado (Rainecki et al., 2010; Sullivan et al., 1990).

A partir desses trabalhos tem sido proposto que o odor da mãe é aprendido mediante os mesmos mecanismos associativos dentro do ninho (Debiec & Sullivan, 2017; Opendak & Sullivan, 2016), pois os filhotes estão expostos simultaneamente ao odor da mãe e às contingências dos estímulos maternos termo táteis. Dessa forma, quando os filhotes foram avaliados fora do ninho, em um labirinto de duas escolhas para o odor do próprio ninho ou odor da mãe *versus* odor de maravalha limpa, os filhotes apresentaram respostas de preferência olfatória para o odor materno ou para o odor do próprio ninho (Meyer & Alberts, 2016). Por outro lado, tem sido sugerido também que as experiências com a mãe dentro do ninho, tanto antes como depois do dia pós-natal 10 são capazes de induzir respostas comportamentais de preferências para os congêneres.

O repertório de comportamento materno da rata lactante é intenso durante os primeiros dias pós-natal. À medida que o período pós-natal avança os

comportamentos maternos diminuem e gradualmente outros comportamentos aumentam. O aprendizado do odor da mãe e do ninho é coincidente com o período em que o cuidado materno é intenso e, no qual, o filhote está exposto dentro do ninho. Entretanto, o aprendizado de preferência por congêneres ocorre em uma janela temporal maior. Possivelmente, certos padrões de comportamento materno após o dia pós-natal 10 sejam importantes para induzir essas preferências. Porém, ainda não está claro como se desenvolvem naturalmente as respostas de preferência olfatória para odores da mãe, do próprio ninho, dos congêneres e outros odores biologicamente relevantes. A maior parte da literatura sobre as preferências olfatórias baseadas na experiência inicial deriva de estudos em filhotes de ratos e, entre estes, as medidas comportamentais envolveram principalmente a seleção de dieta (Galef & Henderson, 1972), preferências para o amontoamento (*huddling*) (Alberts & Brunjes, 1978; Alberts & May, 1984) e outras formas mais complexas de afiliação social (Mainardi et al, 1965).

## 1.2 MOTIVAÇÃO DO ESTUDO

A motivação para a realização do presente estudo surgiu da necessidade de compreender melhor as bases comportamentais do apego e, principalmente, os efeitos do rompimento do vínculo mãe-filhote (apego) no início do desenvolvimento pós-natal, como ocorre nos casos de adoção, sobre os comportamentos filiais, os quais são determinantes para uma vida saudável no futuro. Além disso, este estudo pode lançar mais luz sobre os desvios do desenvolvimento infantil normal e sobre a capacidade das crianças de recuperar o atraso após sofrerem privações significativas, as quais normalmente ocorrem nos casos de crianças entregues para adoção.

## 1.3 PRINCIPAIS PERGUNTAS DE PESQUISA

O presente estudo focou na abordagem das seguintes perguntas:

Pergunta 1: Qual o perfil do desenvolvimento natural das respostas comportamentais de filhotes de ratos a odores biologicamente relevantes e, como essas respostas se alteram durante as três primeiras semanas de vida pós-natal?

Pergunta 2: Quais são as características naturais do comportamento maternal que ocorrem antes, durante e depois do aparecimento das respostas comportamentais de filhotes de ratos a odores biologicamente relevantes?

Pergunta 3: Quais são os efeitos comportamentais da adoção realizada durante dois períodos importantes do desenvolvimento pós-natal (período sensível e período de transição para o pós-sensível a aprendizagem do apego) sobre os comportamentos de filhotes de ratos?

Pergunta 4: Quais são os efeitos comportamentais da adoção realizada durante dois períodos importantes do desenvolvimento pós-natal (período sensível e período de transição para o pós-sensível a aprendizagem do apego) sobre o comportamento materno das fêmeas lactantes cuidadoras?

#### 1.4 HIPÓTESES ESPECÍFICAS

As hipóteses desta pesquisa foram fundamentadas nas experiências iniciais do filhote com o odor materno.

Hipótese 1: O procedimento de adoção cruzada repetidas de fêmeas lactantes durante o período sensível ao aprendizado do apego (RCF precoce) altera a formação do apego mãe-filhote. No entanto, quando este procedimento é realizado durante o período pós-sensível ao aprendizado do apego (RCF tardio) não altera o vínculo mãe-filhote.

Hipótese 2: A troca repetida de filhotes, embora de mesma idade, afeta negativamente o comportamento de cuidado materno para os filhotes que não fossem os seus biologicamente.

## 1.5 ESTRUTURA DA TESE

A presente tese está organizada em 5 capítulos e 1 anexo. A seguir descrevemos brevemente cada capítulo.

O Capítulo 1 faz um breve embasamento teórico que permitiu elaborar as perguntas de pesquisa, as hipóteses do trabalho e os objetivos da tese, apresentando a principal razão que motivou a realização deste trabalho.

No Capítulo 2 descrevemos o primeiro estudo experimental (artigo 1), que teve por objetivo principal traçar o perfil do desenvolvimento comportamental de filhotes neonatos e o padrão do comportamento materno de ratos *Wistar* no mesmo ambiente onde posteriormente foi realizado o estudo dos efeitos da adoção. Neste capítulo expomos a introdução, a metodologia e os resultados, bem como apresentamos uma discussão a cerca da possível relação funcional entre a variação dos repertórios do comportamento materno ao longo do desenvolvimento pós-natal inicial e o aparecimento das respostas comportamentais dos infantes para odores biologicamente relevantes.

O capítulo 3 contém o segundo estudo experimental (artigo 2), realizado para investigar os efeitos comportamentais da adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes (RCF) sobre a formação do vínculo mãe-filhote em dois períodos importantes do desenvolvimento pós-natal: no período sensível a aprendizagem do apego (dias pós-natal 1 a 3) e no período pós-sensível a aprendizagem de apego (dias pós-natal 9 a 11). Da mesma forma, este capítulo contém introdução, metodologia, resultados e uma discussão específica sobre os achados tanto na perspectiva da mãe adotiva como na perspectiva dos filhotes adotados.

O Capítulo 4 apresenta uma discussão geral de ambos estudos e, por fim, o Capítulo 5 encerra essa tese com as conclusões gerais sobre a pesquisa, apontando as principais contribuições deste trabalho e além disso apresenta perspectivas de trabalho decorrentes da própria pesquisa. No Anexo, encontra-se os comprovantes de submissão dos dois artigos para as respectivas revistas.

## 1.6 JUSTIFICATIVA

A Neurociência tem feito progressos no estudo sobre as bases neurais do apego através de estudos em humanos (Feldman, 2016; Lenzi et al., 2015) e em

outras espécies, particularmente roedores (Moriceau et al., 2009; Sullivan et al., 2015), e também os eventos ambientais que podem afetar essa relação mãe-filhote (Lucion & Bortolini, 2014). Entretanto existe muitas questões que ainda precisam ser elucidadas, como os efeitos da adoção sobre o comportamento de apego do indivíduo adotado, por exemplo.

Baseado no fato de que as experiências iniciais da criança com a sua mãe (cuidador) fornecem o modelo básico para as relações sócio afetivas na vida adulta e que uma série de situações ocorridas nos primeiros anos de vida, como por exemplo a adoção, podem comprometer o desenvolvimento saudável do indivíduo, é de fundamental importância aprofundar o estudo sobre este tema.

Crianças institucionalizadas, apesar de receberem cuidados adequados, apresentam alterações comportamentais importantes na vida adulta. Essas alterações têm sido fortemente associadas com a falta de uma relação de apego seletivo e consistente com a figura materna no início da vida Bruce et al (2009), porém, ainda não está claro como os processos de adoção alteram a relação mãe-infante no início da vida.

Considerando que crianças adotadas possam estar expostas a experiências de maus-tratos, negligência da família biológica ou das instituições de abrigo, e que elas possam apresentar muitas dificuldades em formar ligações afetivas com seus novos pais adotivos, como por exemplo, uma dependência exagerada da figura de apego, distanciamento emocional, comportamentos de insegurança (Oppenheim et al, 2001), este estudo pode lançar mais luz sobre os desvios do desenvolvimento infantil normal e sobre a capacidade das crianças de recuperar o atraso após sofrerem privações significativas, as quais normalmente ocorrem nos casos de crianças entregues para adoção.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos comportamentais da adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes (RCF) sobre a formação do vínculo (apego) mãe-filhote em dois períodos

importantes do desenvolvimento pós-natal: no período sensível e no período de transição para o pós-sensível a aprendizagem de apego.

## **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar as preferências iniciais para odores biologicamente relevantes de filhotes de ratos machos e fêmeas nos dias pós-natal 3, 7, 11 e 15 (*Artigo 1*);
2. Conhecer o papel das variações naturais do comportamento materno nos dias pós-parto 2, 6, 10 e 14 sobre o processo de aprendizado de preferências olfatórias dos filhotes em um ambiente natural (*Artigo 1*);
3. Analisar os efeitos da adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes sobre as respostas de preferência olfatória para o odor da mãe biológica e da mãe adotiva em filhotes de ratos, machos e fêmeas, nos dias pós-natal 7 e 15 (*Artigo 2*);
4. Elucidar os efeitos da adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes sobre o sistema de inibição do comportamento de aproximação e ou evitação para o odor de um predador natural, em filhotes de ratos, machos e fêmeas, nos dias pós-natal 7 e 15 (*Artigo 2*);
5. Investigar os efeitos da adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes cuidadoras sobre o comportamento maternal nos dias pós-parto 1 a 6 e 9 a 14 (*Artigo 2*);



### CAPÍTULO III

**ARTIGO II** – Este artigo foi enviado para a revista “*Developmental Psychobiology*”, conforme comprovante no Anexo B.

#### **REPEATED CROSS-FOSTERING AFFECTS MATERNAL BEHAVIOR AND OLFACTORY PREFERENCES IN RAT PUPS**

**Running title:** Cross-fostering and mother-infant relationship

**Andrea Finkler<sup>1, 2, 3\*</sup>, Grace E. Pardo<sup>2, 4</sup>, Aldo Bolten Lucion<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup> Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physiology, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Luterana do Brasil, ULBRA - Av. Farroupilha, 8001, Prédio 1/ Sala 25. Bairro São José, Canoas/RS, 92425-900, Brazil.

<sup>4</sup> Centre for Interdisciplinary Science and Society Studies, Universidad de Ciencias y Humanidades, Los Olivos, Lima, Peru.

**\*Corresponding author:**

A. Finkler [andrea\\_finkler@hotmail.com](mailto:andrea_finkler@hotmail.com), Universidade Luterana do Brasil, ULBRA - Av. Farroupilha, 8001, Prédio 1/ Sala 25. Bairro São José, Canoas/RS CEP: 92425-900, Brazil.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank Bruna Medeiros de Oliveira, Izabela A. Espíndula, Clarissa A. Bellagamba and Thaís Ferreira de Barros for the collaboration during procedures involved in this research. This work was supported by CNPQ and CAPES.

## **ABSTRACT**

Disturbances in early mother-infant relationships are strongly associated with changes in the development of a number of physiological and behavioral systems in the neonate that can create a complex change in patterns of vulnerability throughout life. Institutionalized children, despite receiving adequate care, display important behavioral changes in adult life, and such changes are strongly associated with a lack of selective and consistent attachment to the maternal figure in early life. It is not yet clear how human adoption processes alter the mother-infant relationship early in life. Here, to mimic the situation of human adoption and explore the impact on the formation of attachment between the infant and a caregiver, we use a repeated cross-fostering (RCF) model in rodents in two postnatal periods, postnatal days (PND) 1 to 3 (early RCF) and 9 to 11 (late RCF). Early exposure but not late exposure to RCF reduces the pups' preference for the odor of the mother figure. Moreover, early exposure and slightly later exposure to RCF reduce maternal care and motivation in collecting the pups and bringing them to the nest. The RCF protocol creates an unstable environment for mother-pup interaction, but it seems to affect learned attachment to the mother only when it occurs during the corresponding sensitive period of development.

**Keywords:** Infant attachment behavior; mother-infant interactions; cross-fostering, olfactory preference, sensitive period, maternal behavior, rats.

## **1 INTRODUCTION**

Several studies have consistently shown that mother-pup attachment is a learning process and consequently that this initial filial relationship depends on memory formation (Sullivan & Wilson, 1991; Landers & Sullivan, 2012; Opendak & Sullivan, 2016). In both humans and animals, attachment requires a brief learning experience of the sensory characteristics of the maternal figure (odor, texture, color, sound) that occurs during the infant's first interactions with its caregiver (Debiec & Sullivan, 2017; Rainekei et al., 2010; Sullivan & Holman, 2010).

Altricial neonates must learn their mother's odor and use it to guide their movements. As the mother is the only source of food, warmth and protection, learning this odor is critical to the survival of the newborn (Sullivan, 2003; Landers & Sullivan,

2012). Specifically, the maternal odor controls the interactions of rat pups with the mother, including approach responses, social behavior and attachment to the nipple (Raineke et al., 2010). In rats, the olfactory response of the pup to the odor of the mother is evaluated by orientation and approach behavior toward the odor source and is formed during the first 10 days of the pup's life. In this period, also called the attachment sensitive period, pups can easily be conditioned to a different odor than the maternal one, as long as it is paired with thermal and tactile stimuli (Debiec & Sullivan, 2017; Landers & Sullivan, 2012; Meyer & Alberts, 2016), indicating an associative learning process.

In addition to the importance of the study of the mother-child relationship early in life, there is evidence that this link establishes the basic model of future social behavior (Moriceau et al., 2010; Sullivan et al., 2015), impacting the development of adult sociability (Callaghan et al., 2014). Thus, in this study, we used the protocol of repeated cross-fostering (RCF) by lactating females as an environmental variable in the formation of the attachment between the pup and its mother at the beginning of development, and we analyzed how postnatal environment interventions that tend to disrupt mother-offspring attachment alter these behavioral patterns in rats.

Maternal adoption is an area that has not yet been explored in depth by neuroscience. The rationale of the present work is to mimic the human situation of adoption. Institutionalized children, despite receiving adequate care, exhibit important behavioral changes in adult life, sometimes quite serious (Bruce et al., 2009). For this purpose, we used an experimental model that consists of performing successive daily transfers of pups among lactating female caregivers during their synchronized postnatal period, similar to a previously described experimental protocol (Di Segni et al., 2015). Pup exchange between lactating females occurred during 2 postnatal time windows: during the attachment sensitive period on postnatal days (PND) 1, 2 and 3 and in the transition from the sensitive to the postsensitive period on PND 9, 10 and 11. Using these interventions in the mother-pup relationship, we evaluated the olfactory preference of the pups for the odor of the maternal figure through olfactory preference tests on PND 7 and 15, and to evaluate the pups' ability to target the mother's nipple, we used the nipple attachment test on PND 8 and 16. In addition, we observed the maternal care behavior of the lactating females as well as their motivation to collect the pups and take them to the nest from PND 1 to PND 6 or from PND 9 to

PND 14, respectively. Finally, we studied the effect of the repeated exchange of lactating female caregivers on the behavioral inhibition system of olfactory preference of the pups through approach and avoidance responses to a naturally aversive stimulus on PND 7 and 15.

Our hypothesis is that the RCF procedure affects the formation of the developing mother-pup attachment, considering the instability that the procedure triggers. The RCF in an animal model differs from the adoption of children because, among other aspects, the rat pups are cared for and nursed by lactating females in the same postpartum period. However, the procedure of fostering by the exchange of the mother creates an unstable neonatal environment for the pups by disrupting the bond with the specific caregiver.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 SUBJECTS AND HOUSING CONDITIONS**

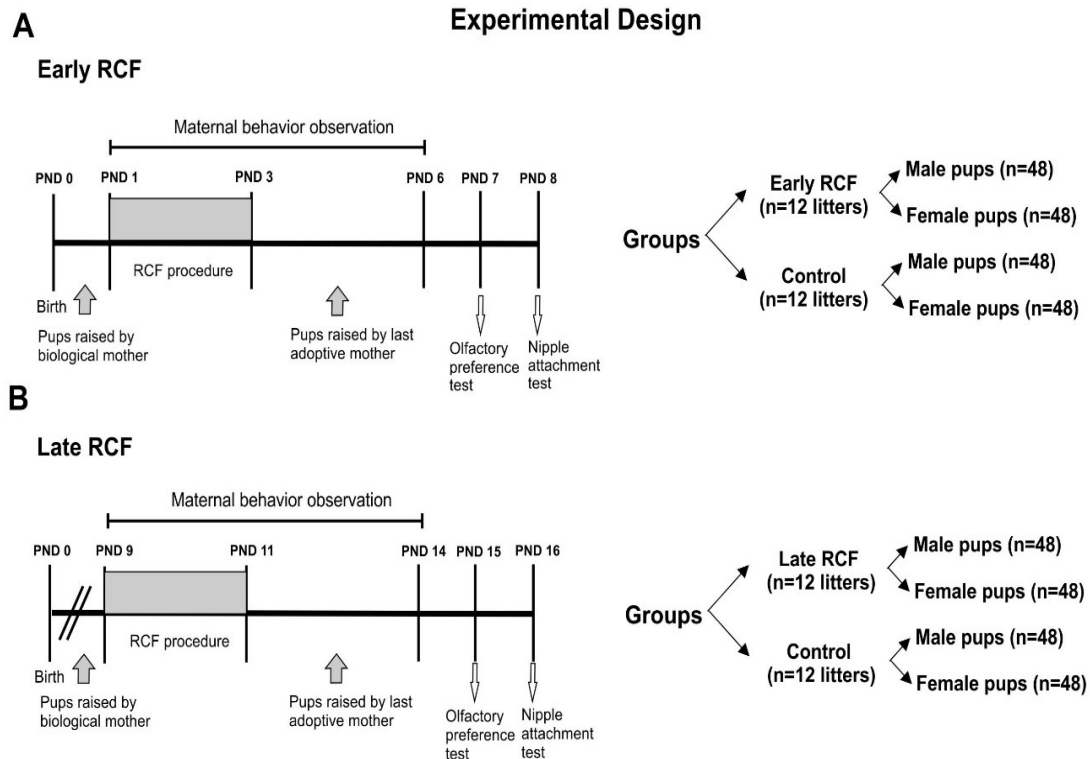
Forty-eight females and twelve male Wistar rats, all adults (PND 70), were obtained from the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL), UFRGS, Porto Alegre, and were group housed in transparent acrylic cages (4 animals per 45 × 31 × 21 cm cage) with food (Nutrilab, Colombo, Brazil) and filtered water freely available. The colony room was maintained at constant humidity (38%) and temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 06h00).

After two weeks of habituation, virgin females were mated with males on the evening of proestrus. The presence of spermatozooids in the vaginal smear the following morning was considered an indicator of pregnancy, and this day was designated gestational day (GD) 0. On GD 16, the pregnant rats were individually housed in transparent acrylic cages (dimensions described above) and were left undisturbed. All litters were born within 12 h of each other and were examined until 11h00 of each day (from GD 21 to GD 22). The day of birth was considered day 0. A group of litters remained for 24 h (until PND 1) with their biological mothers, and other litters remained with their biological mothers until PND 9. On the morning of PND 1, all

litters were standardized to 8 pups (4 male and 4 females) and randomly assigned to RCF or control conditions. Animal care and all behavioral experiments were performed according to the guidelines of the National Institutes of Health (NIH) and the domestic National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethics Committee in Use of Animals (CEUA) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (No. 31562/2016) (Appendix B).

## 2.2 RCF MODEL

The RCF protocol used in this work was based on previous studies (Bartolomucci et al., 2004; D'Amato et al., 2011; Luchetti et al., 2015). Litters (8 pups) were exchanged between dams on PND 1 or PND 9, and this procedure was repeated every 24 h for 3 consecutive days, from PND 1 to PND 4 (early RCF group) or from PND 9 to 11 (late RCF group). The dams were removed from their home cages and temporarily placed in empty cages with clean wood shavings as bedding. Next, the litters were carefully removed from the nest and placed in the cages of their foster mothers, and the dams were returned to their home cages. The procedure occurred between 10h30 and 11h00 and took no longer than 3 min. After the last change, on PND 3 or PND 11, the pups remained with their last foster mother until PND 6 or PND 14. Therefore, each litter was cared for by four different mothers: one biological and three foster mothers. The same procedure was applied to the control group dams on the same days and at the same times as the RCF groups except that they were returned to their own litters. During the days of the RCF procedure, before returning to their foster nest or home nest, each pup was weighed. For each behavioral measurement, one male and one female sibling per litter was used. A total of 384 pups (192 males and 192 females) were used for behavioral measurements, half on PND 7 and the other half on PND 15. The timing of the experimental procedures and the total numbers of litters and pups used are reported in Figure 1.



**Figure 1.** Design of the cross-fostering experiment. Offspring rats changed caregivers every day, from one day after birth (PND 1) until PND 3 (early repeated cross-fostering) (A) or from PND 9 until PND 11 (late repeated cross-fostering) (B), experiencing four different caregivers (1 biological mother and 3 foster mothers). After the fostering period, the last foster mother raised the pups until PND 8 or until PND 16. Maternal behavior was observed during the cross-fostering period and three days after. On PND 7 or PND 15, the pup was tested for olfactory preferences in a two-choice test, and they were tested for maternal nipple attachment on PND 8 or PND 16. The distribution of experimental groups and the number of pups tested are described in the right.

## 2.3 BEHAVIORAL PROCEDURES

### 2.3.1 Maternal behavior

Video cameras were positioned lateral to the housing cages for maternal behavior recording from PND 1 to PND 6 or from PND 9 to PND 14. A discrete observation was made every 3 min within each observation period during four periods per day: 3 during the light phase (09h00, 12h00, 15h00) and one at the beginning of the dark phase (18h00) (with 25 observations in 4 periods per day = 100 total

observations/mother/day) (Pardo et al., 2016). For each observation, the location of the mother (in or out the nest) was noted. If the mother was in the nest, the following nursing postures were noted: high crouch posture (mother nursing pups in an arched-back posture); low crouch posture (mother nursing pups in a "blanket" low arched-back posture); supine posture (a passive posture in which the mother is lying on her back or side while the pups nurse). We also recorded licking of the pups (licking the surface of their bodies and their anogenital regions), nest building, and self-grooming behavior.

The total nursing behavior was calculated by adding the scores for nursing postures and licking pups during the recording periods (12h00, 15h00 and 18h00). Recordings from the 09h00 period are presented separately because the RCF procedure was performed after. To evaluate the variation in the nursing behavior in the RCF and control groups, we separately compared the cumulative mean scores of the two groups during the period of the RCF procedure on PND 3 or 11 (corresponding to PND 1, 2 and 3 or PND 9, 10 and 11, respectively) and after the period of the RCF procedure on PND 6 or 14 (corresponding to PND 4, 5, and 6 or PND 12, 13, and 14, respectively).

### **2.3.2 Pup-retrieval test**

Control and early RCF dams were tested for pup-retrieval behavior from PND 1 to 4, between 10h30 and 11h00 (twenty-four hours after the last change of litters). After the litter was removed from the home nest, they were weighed and then distributed across the floor of their own home cage or that of their foster mother. The dam was placed back in her home cage, and the number of retrieved pups and the latency to retrieve each of them were recorded. The test ended when the mother collected the 5<sup>th</sup> pup or when 15 min of observation had been completed. This test was not performed in the late RCF group because older pups exit and enter the nest alone, and dams have reduced retrieval behavior. To assess any variation in maternal motivation between control and early RCF dams, we compared the cumulative latency to retrieve the first and fifth pups during the four postpartum days.

### 2.3.3 Olfactory preference test

Pups from the control and RCF groups were subjected to olfactory preference tests using a Y-maze apparatus on PND 7 and PND 15. The Y-maze consisted of three arms constructed from transparent acrylic (L 12 × W 12 × H 20 cm). One of the arms was the starting zone (L 8.5 × W 8 × H 20 cm), where the pup was placed at the beginning of the test. The other two arms (L 8.5 × W 8 × H 20 cm) were connected to small acrylic boxes with several holes in the walls (L 12 × W 12 × H 20 cm), with each of the two boxes containing the stimuli for the tests. These small acrylic boxes were attached to an air pump (aquarium air pump, Master Brand, Super Type II) that propelled air into the chamber at a flow rate of 2 L/min. The purpose of this air pump was to move the bedding odors or test odors toward the arms of the maze through the perforated walls. We tested the following stimuli combinations: clean bedding vs home bedding, pregnant female bedding (collected from on GD 20 and stored in refrigerator at -5° C until the day of test) or sand with cat urine. A portion of home bedding (300 ml) or sand with cat urine (60 grs) was placed in one of the Y-maze arms, and a portion of clean bedding (300 ml) was placed in the other arm. On postnatal day 7, one male and one female pup from each litter were removed from the nest (the order of removal was always randomized), when placed in a small box equipped with paper towels and transported to the behavior test room (maintained at a temperature of 28°-29° C). Each pup was placed in the starting area of the Y-maze, and after 5 s, the two doors dividing the maze arms were removed. Pup behavior was videotaped (Sony Handycam). The test was performed in five consecutive trials of 1 min each with 30-second intervals between each trial. At the end of each session, the pup was placed in the same box used for transportation, the Y-maze was cleaned with water, and the positions of the stimuli in the two arms were switched. After the test, the pups were returned to their nests, and each tested pup was given a mark (with a nontoxic permanent marker) on one of their legs.

The videos were analyzed using the software EthoWatcher (Crispim Junior et al., 2012). We recorded the time the pups spent over one of the areas of tested stimuli. The criterion defining the entry of the pup into one of the arms of the maze was when its whole body passed the line that divided that arm from the starting zone. Animals that did not enter either of the odor areas during the 5 test trials were considered nonresponsive pups. The results are expressed as the percentage of time the pup



remained in each arm of the maze during the 5 trials of the test. The sum of the total time spent over one of the areas in the 5 trials was divided by the total duration of the test (300 s) and multiplied by 100. From there, the mean  $\pm$  SEM or the median (IQ) for each experimental group was calculated and then used to compare the RCF and control groups.

#### **2.3.4 Nipple attachment test**

On PND 8 or PND 16, pups from each litter were tested for nipple attachment on their anesthetized biological mother (control and RCF group) or last foster mother (RCF group). On the test, the dams were removed from their nests, anesthetized with ketamine (35 mg/kg i.p) and xylazine (3 mg/kg i.p), placed on her side on the floor of a holding cage (25  $\times$  40  $\times$  20 cm) and transported to the behavior test room (maintained at 28°-29° C temperature). The dams were anesthetized to eliminate any active role in the pups' performance during the test and prevent milk let-down (Rainekei, et al., 2010). Two minutes later, pups from each litter were removed from their nest, placed in small holding cages covered with paper towel and transported to the behavior test room. For the test, the anesthetized dam was placed on her side in a transparent acrylic cage (25  $\times$  40  $\times$  20 cm) heated to a standard nest temperature (28°-29° C). The pups were placed in the acrylic cage with the anesthetized dam, approximately 15 cm away. A 3-min observation period was allowed to each pup. The latency to reach the dam's ventrum and suckle at her nipple was recorded. Pups from the control group were tested to attach to their biological mother's nipple (1 male and 1 female), and pups from the RCF group were tested in two ways: to attach to their biological mother's nipple (1 male and 1 female) or to attach their last foster mother's nipple (1 male and 1 female). Pups used in the nipple attachment test were those tested in the olfactory preference test on PND 7 to home bedding (biological or last foster mother) or pregnant nest bedding (biological mother with GD 20). After a 3-min test, the pups were returned to the holding cage, remained there until the other siblings were tested and then returned together to their home nests. Before returning to the nests, the dams were allowed to recover from the anesthesia (approximately 30-40 min) in the behavior test room. All tests were recorded on video for further analysis. The mean latency to attach the dam's nipples was calculated and compared between the control and RCF groups.

## 2.4 BODY WEIGHT GAIN OF PUPS

From the daily recording of the pup's body weight from PND 1 to PND 4, the variation in body weight gain (delta weight, g) was calculated using the following formula: delta weight = (final weight on the PND 4 – initial weight on PND 1). The variation in weight gain was calculated separately for male and female pups, and the mean of the delta weight was compared between the control and RCF groups for each sex.

## 2.5 STATISTICAL ANALYSIS

For each experimental group, data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov normality test. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM or median (IQ), and the number of animals per group is expressed as "*n*". All data were analyzed using GraphPad Prism 8 Software (San Diego, CA). Data with normal distribution were analyzed through a parametric Student's *t*-test or two-way ANOVA, and data that did not meet the requirements of normality were analyzed by nonparametric tests, such as the Kruskal-Wallis test, Wilcoxon test or Mann-Whitney U test. For all tests, statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Significant results are indicated by asterisks (\*) in the figures and in bold in the associated tables.

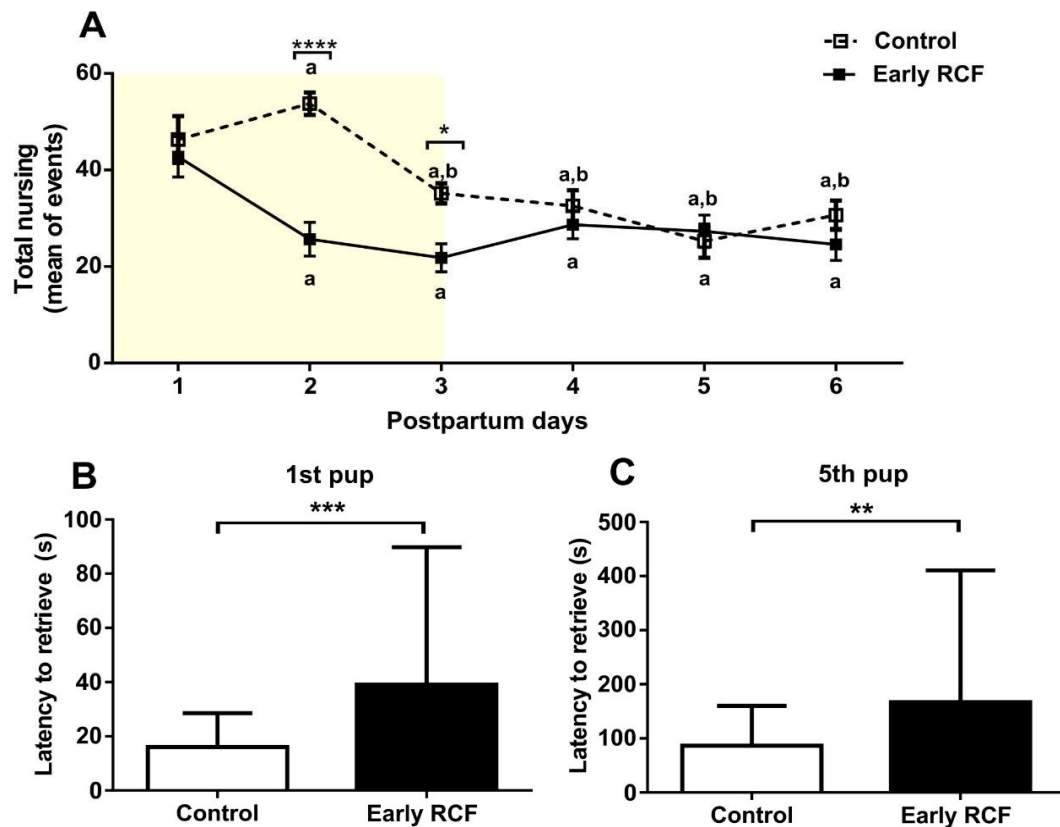
## 3 RESULTS

### 3.1 EFFECT OF EARLY RCF ON MATERNAL BEHAVIOR OF LACTATING FEMALES

### 3.2 NURSING BEHAVIOR

To identify any variation in the maternal care induced by the RCF protocol application, we recorded the maternal behavior during the period of the RCF procedure

(PND 1-PND 3) and during the next two days (PND 4-PND 6). Two-way ANOVA was applied to the maternal behavior data set to assess the relative effect of the early RCF procedure and the progress of the postpartum period on the total nursing behavior pattern. Lactating females of both groups gradually reduced their nursing behavior from PND 1 to 6, and this pattern was significantly affected by the early RCF procedure [Interaction postpartum period  $\times$  RCF procedure:  $F(5,110) = 6.09$ ;  $p < 0.0001$ ]. Bonferroni's post hoc analysis showed that lactating females that experienced the RCF procedure significantly reduced their nursing behavior at PND 2 [early RCF:  $25.67 \pm 3.50$ ,  $n=12$  vs Control:  $53.75 \pm 2.34$ ,  $n=12$ ;  $p < 0.0001$ ] and at PND 3 [early RCF:  $21.83 \pm 2.91$ ,  $n=12$  vs Control:  $37.17 \pm 2.10$ ,  $n=12$ ;  $p < 0.05$ ] (Figure 2A).



**Figure 2.** Effects of early repeated cross-fostering on nursing behavior and maternal motivation. (A) Comparison of the number of total cumulative events of nursing behavior (high crouch+ low crouch licking + supine +high crouch licking postures), recorded at 12 h, 15 h, and 18 h between the control and early RCF groups from PND 1 to 6. Comparison of cumulative latency to retrieval the first (B) and five pups (C) between control and early RCF group lactating females from PND 1 to 4. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  control vs early RCF group. <sup>a</sup> A

significant change in comparison with PND 1. <sup>b</sup> A significant change in comparison with PND 2. For all groups, n=12 litters. RCF: repeated cross-fostering group.

Table 1 shows the total nursing score, which was the sum of high crouching, low crouching, supine and licking behaviors. The score was discriminated by period of the day and postpartum day. On day 2, at the three timepoints after the RCF procedure (12h00, 15h00 and 18h00), the early RCF group showed a significant decrease in the score in comparison with the control group. This was also observed on day 3 and day 6, at 15h00.

Table 1: Effects of the early RCF procedure on the total nursing behavior score (sum of nursing behaviors) during 4 periods per day.

PND	Period of observation	Groups		t (22)	P value
		Control (n=12)	Early RCF (n=12)		
Day 1	09h00	20.25 ± 2.00	18.33 ± 1.87	0.70	0.49
	12h00	20.00 ± 2.07	18.83 ± 1.65	0.44	0.66
	15h00	16.92 ± 2.18	15.67 ± 2.11	0.41	0.68
	18h00	9.42 ± 1.91	8.25 ± 1.54	0.48	0.64
Day 2	09h00	22.00 ± 1.17	20.83 ± 0.84	0.81	0.43
	<b>12h00</b>	<b>25.50 ± 1.18</b>	<b>14.58 ± 2.12</b>	<b>4.51</b>	<b>0.0002</b>
	<b>15h00</b>	<b>20.92 ± 1.67</b>	<b>6.75 ± 1.07</b>	<b>7.14</b>	<b>&lt;0.0001</b>
	<b>18h00</b>	<b>7.33 ± 1.05</b>	<b>4.33 ± 1.18</b>	<b>1.91</b>	<b>0.07</b>
Day 3	09h00	17.50 ± 3.52	18.25 ± 1.91	0.19	0.85
	12h00	16.25 ± 1.73	12.08 ± 1.74	1.69	0.10
	<b>15h00</b>	<b>15.50 ± 1.73</b>	<b>6.75 ± 1.26</b>	<b>4.09</b>	<b>0.0005</b>
	18h00	3.42 ± 1.33	3.00 ± 0.98	0.25	0.80
Day 4	09h00	21.00 ± 1.39	19.08 ± 1.65	0.88	0.38
	12h00	15.83 ± 2.02	14.25 ± 1.94	0.57	0.58
	15h00	12.33 ± 1.79	11.17 ± 2.17	0.41	0.68
	18h00	4.42 ± 1.18	3.25 ± 0.59	0.88	0.39
Day 5	09h00	15.33 ± 2.39	17.58 ± 1.42	0.81	0.43
	12h00	12.33 ± 1.68	15.67 ± 1.64	1.42	0.17
	15h00	9.92 ± 1.66	7.92 ± 1.86	0.80	0.43
	18h00	3.00 ± 0.83	3.75 ± 1.19	0.52	0.61
Day 6	09h00	16.75 ± 2.19	16.25 ± 2.06	0.17	0.87
	12h00	15.25 ± 2.53	13.83 ± 1.79	0.46	0.65
	<b>15h00</b>	<b>13.25 ± 1.29</b>	<b>7.25 ± 1.48</b>	<b>3.06</b>	<b>0.006</b>
	18h00	2.17 ± 0.63	3.50 ± 1.57	0.79	0.44

Note. Data are presented as the mean ± SEM and represent the cumulative maternal nursing score (number of high crouch posture + low crouch posture + supine posture + licking) on 4 periods of observation from PND 1 to 6. The early RCF procedure was performed between the observation periods at 09h00 and 12h00. Parentheses contain the number of litters. Significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Student's *t*-test are indicated in bold.

Table 2 shows the cumulative score of maternal behavior parameters at PND 3 and at PND 6. At PND 3, immediately after the RCF procedure (from PND 1 to PND 3), the early RCF group showed a significant decrease in high crouching posture but

an increase in self-grooming behavior and exits from the nest. Furthermore, after finishing the RCF procedure, the early RCF group showed a significant increase in low crouch posture and a significant increase in nest building behavior as well as self-grooming behavior.

Table 2. Cumulative maternal behavior during the early RCF procedure period (PND 1- PND 3) and during the first six postpartum days (PND 1 – PND 6).

Behavioral parameters (number of observations)	PND	Groups		<i>t</i> (22)	<i>P</i> value
		Control (n=12)	Early RCF (n=12)		
Total Nursing	<b>PND 3</b>	<b>135.3 ± 6.98</b>	<b>90.25 ± 6.10</b>	<b>4.85</b>	<b>&lt;0.0001</b>
	PND 6	88.50 ± 6.37	80.58 ± 7.04	0.83	0.41
High crouch posture	<b>PND 3</b>	<b>101 ± 5.59</b>	<b>58.17 ± 4.75</b>	<b>5.83</b>	<b>&lt;0.0001</b>
	PND 6	53.08 ± 5.74	47.42 ± 5.71	0.70	0.49
Low crouch posture	PND 3	8.75 ± 2.54	10.67 ± 2.33	0.56	0.58
	<b>PND 6</b>	<b>7.67 ± 1.79</b>	<b>21.67 ± 3.49</b>	<b>3.57</b>	<b>0.002</b>
Supine Posture	PND 3	7.25 ± 2.29	5.58 ± 1.15	0.65	0.52
	PND 6	15.83 ± 3.37	7.67 ± 2.43	1.96	0.06
Licking	PND 3	0.75 ± 0.35	1.50 ± 0.53	1.18	0.25
	PND 6	0.83 ± 0.29	2.17 ± 0.65	1.87	0.07
High crouch posture and licking	PND 3	17.50 ± 1.79	14.33 ± 2.10	1.15	0.26
	PND 6	16.50 ± 1.57	12.33 ± 1.77	1.76	0.09
Nest building	PND 3	8.33 ± 3.05	8.08 ± 1.64	0.07	0.94
	<b>PND 6</b>	<b>2.75 ± 0.91</b>	<b>7.83 ± 1.81</b>	<b>2.51</b>	<b>0.02</b>
Dam off-nest	<b>PND 3</b>	<b>76.25 ± 6.67</b>	<b>122.9 ± 4.78</b>	<b>5.69</b>	<b>&lt;0.0001</b>
	PND 6	125.6 ± 5.39	137.3 ± 7.53	1.27	0.22
Self-grooming	<b>PND 3</b>	<b>16.08 ± 1.57</b>	<b>23.50 ± 2.07</b>	<b>2.85</b>	<b>0.009</b>
	<b>PND 6</b>	<b>21.67 ± 2.69</b>	<b>29.08 ± 1.07</b>	<b>2.56</b>	<b>0.02</b>

Note. Data are presented as the mean ± SEM and represent the accumulated occurrence of the behavior from PND 1 to 3 (reported at PND 3) and from postpartum days 1 to 6 (reported at PND 6) recorded at 12h00, 15h00 and 18h00. Parentheses contain the number of litters. Student's *t*-test indicated significant differences ( $p < 0.05$ ) in bold.

### 3.2.1 Pup retrieval

From PND 1 to PND 4, in the period immediately after performing the RCF protocol, we recorded the latency of lactating females to collect the first and fifth pups to the nest in their own home cages. Analysis of the cumulative data from the four days shows that lactating females from the early RCF group take significantly longer time to collect the first pup [Control: Mdn 16 (8.25-28.50) vs Early RCF: Mdn 39 (18-89.75);

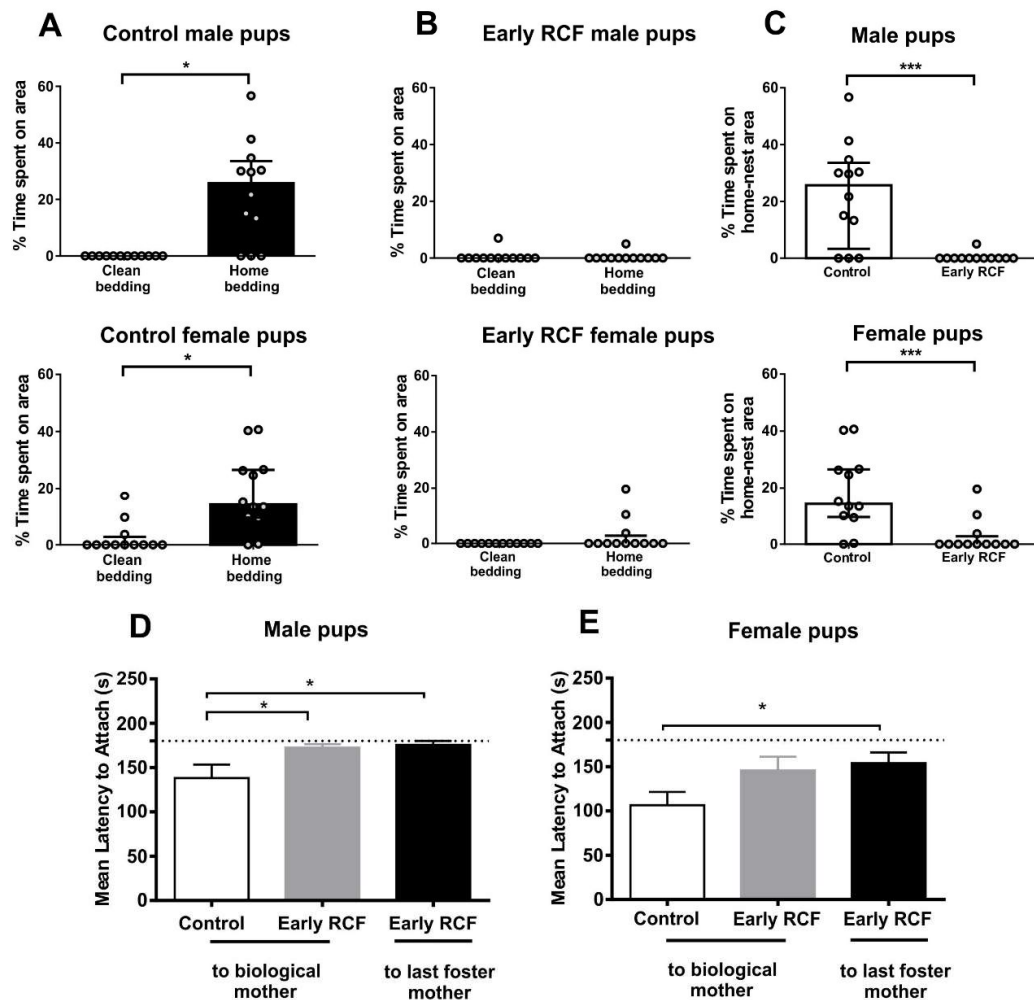
U=672,  $p= 0.0004$ , Mann-Whitney Test] (Figure 2 B) and the fifth pup [Control: Mdn. 86.5 (61.75-160.3) vs Early RCF: Mdn 167 (79-410.5); U=790,  $p= 0.0076$ , Mann-Whitney Test] (Figure 2 C) in comparison with the latencies from control group lactating females.

### 3.3 EFFECT OF EARLY RCF ON THE OLFACTORY PREFERENCE OF RAT PUPS ON POSTNATAL DAY 7

#### 3.3.1 Biological or adoptive mother nest bedding vs clean bedding

To understand how RCF at early postnatal periods might affect the capacity of rat pups to form attachment to their caregiver, we submitted infant rats to the RCF protocol for 3 days (from PND 1 to PND 3). On PND 7, early RCF (to the last adoptive mother nest bedding) and control rats (biological mother nest material) were tested based on the amount of time they spent in the nest bedding area. In the olfactory preference test, early RCF group pups were less responsive to the stimuli presented than the control group pups. From 24 pups tested in the early RCF group, only 4 pups (male: 1 of 12 tested; female: 3 of 12 tested) were entered at least one of the arms of the Y-maze. In the control group, from 24 pups, 20 were actively responsive to at least one stimulus presented (male: 9 of 12 tested; female: 11 of 12 tested).

Male (median of 25.67 s) and female pups (median of 14.17 s) from the control group spent significantly more time in the biological mother's nest area compared to their time in the clean bedding area (0 s) [male:  $W=45$ ,  $p=0.0039$ ;  $n=9$ ; female:  $W = 66$ ,  $p = 0.0010$ ;  $n = 11$ ; Wilcoxon rank test] (Figure 3 A). On the other hand, male and female pups from the early RCF group spent a median of 0 s in the adoptive mother bedding area as well as in the clean bedding area (Figure 3 B). Comparison of the time spent over the area of home bedding between control and early RCF pups show that male [early RCF. Mdn: 0 (0-0) vs. control, Mdn: 25.67 (3.33-33.58); U=19.50;  $p=0.0003$ ,  $n=12$ , Mann-Whitney test] and female pups [early RCF. Mdn: 0 (0-2.75) vs. Control, Mdn 14.17 (9.5-26.58); U=14.50;  $p=0.0006$ ,  $n=12$ , Mann-Whitney test] from the early RCF group spent a significantly less time over the area of home bedding than male and female pups from the control group (Figure 3 C).



**Figure 3.** Effect of early repeated cross-fostering on the olfactory preference to home bedding odor on postnatal day 7 and nipple attachment on postnatal day 8. **(A)** Comparison of the percentage of time over the area of home bedding odor of male (above) and female pups (below) from the control group. **(B)** Comparison of percentage over the area of home bedding odor (corresponding to the last foster mother) of male (above) and female pups (below) from the early RCF group. **(C)** Comparison of percentage of time over the area of home bedding odor between control and early RCF group male (above) and female pups (below). Data are expressed as the median (IQ). \* $p < 0.05$  clean bedding vs home bedding and \*\*\* $p < 0.001$  controls vs early RCF group. Comparison of the latency to attach to biological or last foster mother's nipple in male **(D)** a female pups **(E)** from the control and early RCF groups. \* $p < 0.05$ , significantly different from the control group. For all groups,  $n = 12$  pups. RCF: repeated cross-fostering group.

### 3.3.2 GD 20 Biological mother nest-odor vs clean bedding

To evaluate the behavior of the pups in response to the odor of their biological mother, we used nest material from GD 20 pregnant rats (biological mothers) after the

pups had undergone the RCF procedure. It was thought as a control group through which we could evaluate the behavior of pups in response to the odor of their biological mother after having been submitted to the RCF procedure. We expected that pups could express the memory of their biological mother. The drawback in the group is mainly the preservation of the stimulus. Sawdust with mother's feces was preserved at -5° C of GD 20 until the olfactory preference test day.

Similar to the biological or adoptive mother preference test, from 24 pups tested in the early RCF group, only 4 pups (male: 3 of 12 tested; female: 2 of 12 tested) were entered at least one of the arms of the Y-maze. In the control group, from 24 pups, 17 were actively responsive to at least one stimulus presented (male: 9 of 12 tested; female: 8 of 12 tested). Table 3 shows that male and female responsive pups from the early RCF group spent a reduced time over the area of pregnant rat nest material or clean bedding. On the other hand, male and female pups from the control group spent slightly longer time in the GD pregnant rat nest material area than in the clean bedding area.

Table 3: Olfactory behavioral responses to biologically relevant odors in male and female pups on PND 7 and PND 15 that experienced early or late cross-fostering procedure.

Group	Sex	N	Clean bedding	Tested odor	W or t (11)	P value
<b>PND 7</b>			<b>Clean bedding vs Pregnant rat nest bedding</b>			
Control	M	9	0 (0-11.08)	9 (0-24.17)	29	0.09
	F	8	0 (0-4.25)	5.5 (0-10.75)	22	0.15
Early RCF	M	3	0 (0-9.75)	0 (0-0)	-6	0.25
	F	2	0 (0-0)	0 (0-0)	-3	0.50
			<b>Clean bedding vs Predator odor</b>			
Control	M	7	1.61 (0-14.25)	0 (0-0)	-16	0.20
	F	4	0 (0-8.67)	0 (0-0)	-10	0.13
Early RCF	M	0	-	-	-	-
	F	0	-	-	-	-
<b>PND 15</b>			<b>Clean bedding vs Pregnant rat nest bedding</b>			
Control	M	11	14.42 ± 4.48	23.97 ± 4.55	1.45	0.17
	F	11	<b>12.36 ± 2.42</b>	<b>32.14 ± 4.85</b>	<b>4.36</b>	<b>0.001</b>
Late RCF	M	10	29.78 ± 5.84	18.19 ± 4.64	1.69	0.12
	F	12	27.03 ± 6.35	21.19 ± 4.83	0.61	0.55
			<b>Clean bedding vs Predator odor</b>			
Control	M	10	<b>13.19 ± 3.95</b>	<b>6.08 ± 2.25</b>	<b>2.64</b>	<b>0.02</b>
	F	9	<b>21.75 ± 5.42</b>	<b>6.83 ± 2.48</b>	<b>2.86</b>	<b>0.02</b>
Late RCF	M	7	16.67 ± 6.93	3.38 ± 1.21	1.87	0.08
	F	8	13.75 ± 5.67	7.22 ± 2.24	1.43	0.18



Note. Data represent the percentage of time that responsive pups spent over the areas of the Y-maze during five trials of the olfactory preference test. Parametric data are represented as the mean  $\pm$  SEM, and nonparametric data are represented as the median (IQ). Parametric and nonparametric data were analyzed using Student's *t*-test and Wilcoxon's test, respectively. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold.

### **3.3.3 Predator odor vs clean bedding**

To evaluate the response to predator, pups were exposed to sand with cat urine vs clean bedding and measured the behavioral responsive and avoidance behavior to this stimulus. Male and female pups from early RCF group pups were less responsive to the stimuli presented than the control group pups. None of the 24 pups (male and female) tested in the early RCF group were entered into the arms of the Y-maze. On the other hand, in the control group, from 24 pups, 11 were actively responsive to at least one stimulus presented (male: 7 of 12 tested; female: 4 of 12 tested). These responsive pups from the control group spent more time in the clean bedding area than in the predator odor area (Table 3).

### **3.3.4 Effect of early RCF on nipple attachment behavior of pups at PND 8**

To understand how RCF at early postnatal periods can affect the ability of pups to use the maternal odor to locate the mother nipples, we evaluated the latency to reach the nipple of the caregiver in pups with PND 8 that experienced an early RCF protocol during PND 1-3. Control pups remained with their biological mother until the test day. Early RCF group pups were tested to their anesthetized last adoptive mother or to their biological mother, and control group pups were tested to their biological mother. When early RCF group pups were tested to their adoptive mother, only 7 of 24 pups (1 male and 6 female) attached the nipple of the lactating female. A similar pattern was observed when the pups were tested to their biological mother, only 7 of 24 pups (3 male and 4 female) attached to the biological mother's nipple. On the other hand, 16 of 24 pups from the control group attached to their biological mother (6 males

and 10 females). All pups in the three tested groups that failed to attach were observed to remain in the stating zone when they were placed at the beginning of the test.

Male (Figure 3 D) and female pups (Figure 3 E) from the early RCF group had a similar mean latency to attach to their biological mother's nipple (male:  $172.5 \pm 4.11$ ; female pups:  $145.8 \pm 15.69$ ) or to their last foster mother (male pups:  $175.8 \pm 4.17$ ; female pups:  $154 \pm 12.03$ ) [male pups:  $t(22) = 0.57$ ;  $p=0.57$  and female pups:  $t(22) = 0.42$ ;  $p=0.68$ , unpaired Student's  $t$ -test]. The mean latency to attach to the biological mother was higher in male pups from the early RCF group than in male pups from the control group [Control:  $138.2 \pm 15.17$  vs early RCF:  $172.5 \pm 4.11$ ;  $t(22) = 2.18$ ,  $p=0.04$ , unpaired Student's  $t$ -test].

Furthermore, male pups from the early RCF group showed a higher latency to attach to their last foster mother compared to the latency to attach to biological mother in male pups from the control group [Control:  $138.2 \pm 15.17$  vs early RCF:  $175.8 \pm 4.17$ ;  $t(22) = 2.39$ ,  $p=0.025$ , unpaired Student's  $t$ -test] (Figure 3 D). Similarly, female pups from the early RCF group showed slightly higher latencies to attach to their biological mother [control:  $106.6 \pm 14.88$  vs. early RCF:  $145.8 \pm 15.69$ ;  $t(22) = 1.81$ ,  $p= 0.08$ , unpaired Student's  $t$ -test] or their last foster mother [control:  $106.6 \pm 14.88$  vs. early RCF:  $154 \pm 12.03$ ;  $t(22) = 2.48$ ,  $p= 0.02$ , unpaired Student's  $t$ -test] when compared to female pups from the control group (Figure 3 E).

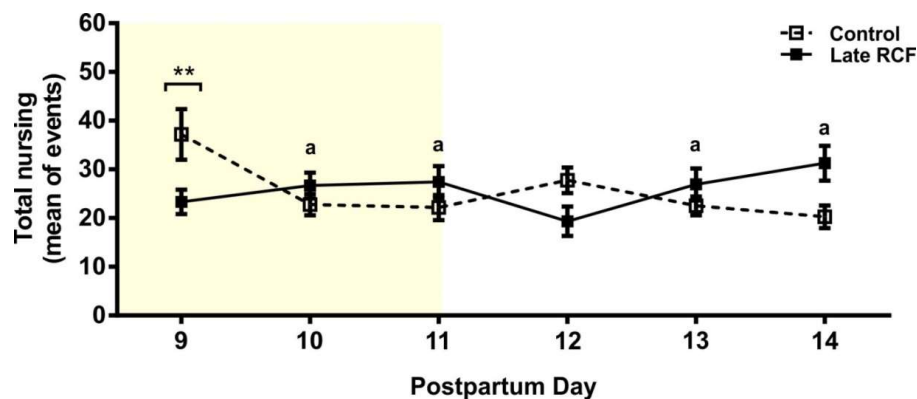
### 3.4 EFFECT OF EARLY RCF ON PUPS' WEIGHT GAIN

To verify that the RCF procedure did not affect the nutrition of the pups, we measured the pup's weight during each day of the RCF protocol procedure (PND 1-4) and calculated the total weight gain variation during 3 days of the RCF procedure. There was no difference in the variation in gain weight of the early RCF and control groups for both males [RCF:  $20.57 \pm 0.50$  g vs Control:  $21.11 \pm 1.56$ ;  $t(0.94) = 22$ ,  $p = 0.35$ ;  $n= 12$ ; unpaired Student's  $t$ -test] and female pups [RCF:  $20.57 \pm 0.50$  g vs Control:  $22.62 \pm 1.57$  g;  $t(1.50) = 22$ ,  $p = 0.14$ ;  $n= 12$ ; unpaired Student's  $t$ -test].

### 3.5 EFFECT OF LATE RCF ON THE MATERNAL BEHAVIOR OF LACTATING FEMALES

#### 3.5.1 Nursing behavior

Lactating females in both the late RCF and control groups gradually reduced their nursing behavior from PND 9 to 14, and this pattern was significantly affected by the late RCF procedure [Interaction postpartum period  $\times$  RCF procedure:  $F(5,110) = 5.16$ ;  $p = 0.0003$ , two-way ANOVA]. Bonferroni's post hoc analysis showed that lactating females that experienced the RCF procedure significantly decreased their nursing behavior at PND 9 [late RCF:  $23.33 \pm 2.49$ ,  $n = 12$  vs Control:  $37.17 \pm 5.21$ ,  $n = 12$ ;  $p = 0.02$ ] in relation to their pairs from the control group (Figure 4).



**Figure 4.** Effects of late repeated cross-fostering on nursing behavior. Comparison of the number of total cumulative events of nursing behavior (high crouch+ low crouch licking + supine +high crouch-licking postures), recorded at 12 h, 15 h, and 18 h between the control and early RCF groups from PND 9 to 14. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  control vs early RCF group. <sup>a</sup> A significant change in comparison with PND 1. For all groups,  $n = 12$  litters. RCF: repeated cross-fostering group.

Table 4 shows the total nursing score discriminated by the period of the day and postpartum day. On day 9 at 15h00, the late RCF group showed a significant decrease in the score. This was also observed on day 12 at 12h00. On the other hand, on day 13 at 12h00 was observed a significant increase in the score was observed.

Table 4. Effects of late RCF procedure on the total nursing behavior (sum of nursing behaviors) during 4 periods of day

PND	Period of observation	Groups		<i>t</i> (22)	<i>P</i> value
		Control (n=12)	Late RCF (n=12)		
Day 9	09h00	13.42± 1.85	13.33 ±1.84	0.03	0.97
	12h00	14.50 ±2.17	12.25 ± 1.59	0.84	0.41
	<b>15h00</b>	<b>13.67 ±0.92</b>	<b>8.17 ± 1.52</b>	<b>3.09</b>	<b>0.01</b>
	18h00	9.00 ±3.09	2.92 ± 3.20	1.90	0.07
Day 10	09h00	12.33 ±2.41	13.25 ±2.17	0.28	0.78
	12h00	9.25 ± 1.81	11.92 ±1.68	1.08	0.29
	15h00	7.75 ± 0.79	7.42 ± 1.96	0.16	0.87
	18h00	5.75 ± 1.50	7.33 ± 1.38	0.78	0.45
Day 11	09h00	15.17 ± 1.80	16.83 ± 1.36	0.74	0.47
	12h00	9.92 ±1.82	13.42 ±1.67	1.42	0.17
	15h00	9.33 ± 1.42	10.00 ±1.66	0.31	0.76
	18h00	2.92 ± 0.71	4.00 ± 1.28	0.85	0.41
Day 12	09h00	14.00 ±2.42	12.00 ±1.84	0.66	0.52
	<b>12h00</b>	<b>14.50 ±2.17</b>	<b>7.17 ±1.68</b>	<b>2.67</b>	<b>0.01</b>
	15h00	6.67 ± 1.35	7.50 ±1.48	0.42	0.68
	18h00	6.58 ± 1.29	4.67 ± 1.33	1.03	0.31
Day 13	09h00	10.17 ±1.64	9.92 ± 1.28	0.12	0.91
	<b>12h00</b>	<b>7.00 ±1.36</b>	<b>12.67 ±1.88</b>	<b>2.45</b>	<b>0.02</b>
	15h00	8.52 ± 1.69	9.25 ± 1.97	0.39	0.70
	18h00	7.25 ± 1.58	5.00 ± 0.84	1.26	0.22
Day 14	09h00	12.50 ± 1.89	12.83 ± 1.06	0.15	0.88
	12h00	6.50 ± 1.39	11.08 ± 1.88	1.96	0.06
	15h00	9.50 ±2.03	2.08 ± 2.49	0.84	0.41
	18h00	6.33 ± 1.29	10.67 ± 1.70	2.03	0.05

Note. Data are presented as the mean ± SEM and represent the cumulative maternal nursing score (number of high crouch posture + low crouch posture+ supine posture + licking) on 4 periods of observation from PND 9 to 14. A late RCF procedure was performed between the observation periods at of 09h00 and 12h00. Parentheses contain the number of litters. Student's *t*-test indicated significant differences ( $p<0.05$ ) in bold.

Table 5 shows the cumulative score of maternal behavior parameters at PND 11 and PND 14. At PND 11, immediately after the RCP procedure (from PND 9 to PND 11), the late RCF group showed a significant increase in high crouch, high crouch +

licking posture and self-grooming behavior but showed a significant decrease in low crouch and supine posture. Furthermore, days after the RCF procedure, the late RCF group showed an increase in high crouch posture and nest building behavior.

Table 5: Cumulative maternal behavior during the late RCF procedure period (PND 9-PND 11) and during PND 9 to 14.

		Groups			
Behavioral parameters					
(number of observations)	PND	Control (n=12)	Late RCF (n=12)	<i>t</i> (22)	<i>P</i> value
Total Nursing	PND 11	82.08 ± 6.61	77.42 ± 3.98	0.60	0.55
	PND 14	70.50 ± 2.88	77.50 ± 7.58	0.86	0.39
High crouch posture	<b>PND 11</b>	<b>31.42 ± 3.66</b>	<b>44.08 ± 3.49</b>	<b>2.50</b>	<b>0.02</b>
	<b>PND 14</b>	<b>19.75 ± 2.15</b>	<b>36.25 ± 3.34</b>	<b>4.15</b>	<b>0.0004</b>
Low crouch posture	<b>PND 11</b>	<b>25.33 ± 4.51</b>	<b>9.42 ± 1.71</b>	<b>3.30</b>	<b>0.0033</b>
	PND 14	18.67 ± 2.51	13.00 ± 3.28	1.37	0.18
Supine Posture	<b>PND 11</b>	<b>13.00 ± 2.48</b>	<b>7.25 ± 1.43</b>	<b>2.01</b>	<b>0.05</b>
	PND 14	8.00 ± 1.72	9.83 ± 1.54	0.79	0.44
Licking	PND 11	1.83 ± 0.74	2.17 ± 0.52	0.37	0.72
	PND 14	3.75 ± 1.07	3.25 ± 0.98	0.34	0.73
High crouch posture and licking	<b>PND 11</b>	<b>10.50 ± 1.10</b>	<b>14.50 ± 0.99</b>	<b>2.70</b>	<b>0.01</b>
	PND 14	12.67 ± 1.31	15.17 ± 1.83	1.11	0.28
Nest building	PND 11	1.92 ± 1.10	4.33 ± 0.89	1.70	0.10
	<b>PND 14</b>	<b>1.58 ± 0.59</b>	<b>5.66 ± 1.08</b>	<b>3.32</b>	<b>0.003</b>
Dam off-nest	PND 11	139.1 ± 7.25	138.8 ± 3.34	0.03	0.97
	PND 14	156.5 ± 4.29	140.3 ± 7.52	1.87	0.07
Self-grooming	<b>PND 11</b>	<b>9.50 ± 1.49</b>	<b>16.42 ± 2.12</b>	<b>2.67</b>	<b>0.013</b>
	PND 14	11.25 ± 2.11	14.25 ± 1.84	1.07	0.29

Note. Data are presented as the mean ± SEM and represent the cumulative occurrence of the behavior from PND 9 to 11 (reported at PND 11) and from PND 9 to 14 (reported at PND 14). Parentheses contain the number of litters. Student's *t*-test indicated significant differences ( $p < 0.05$ ) in bold.

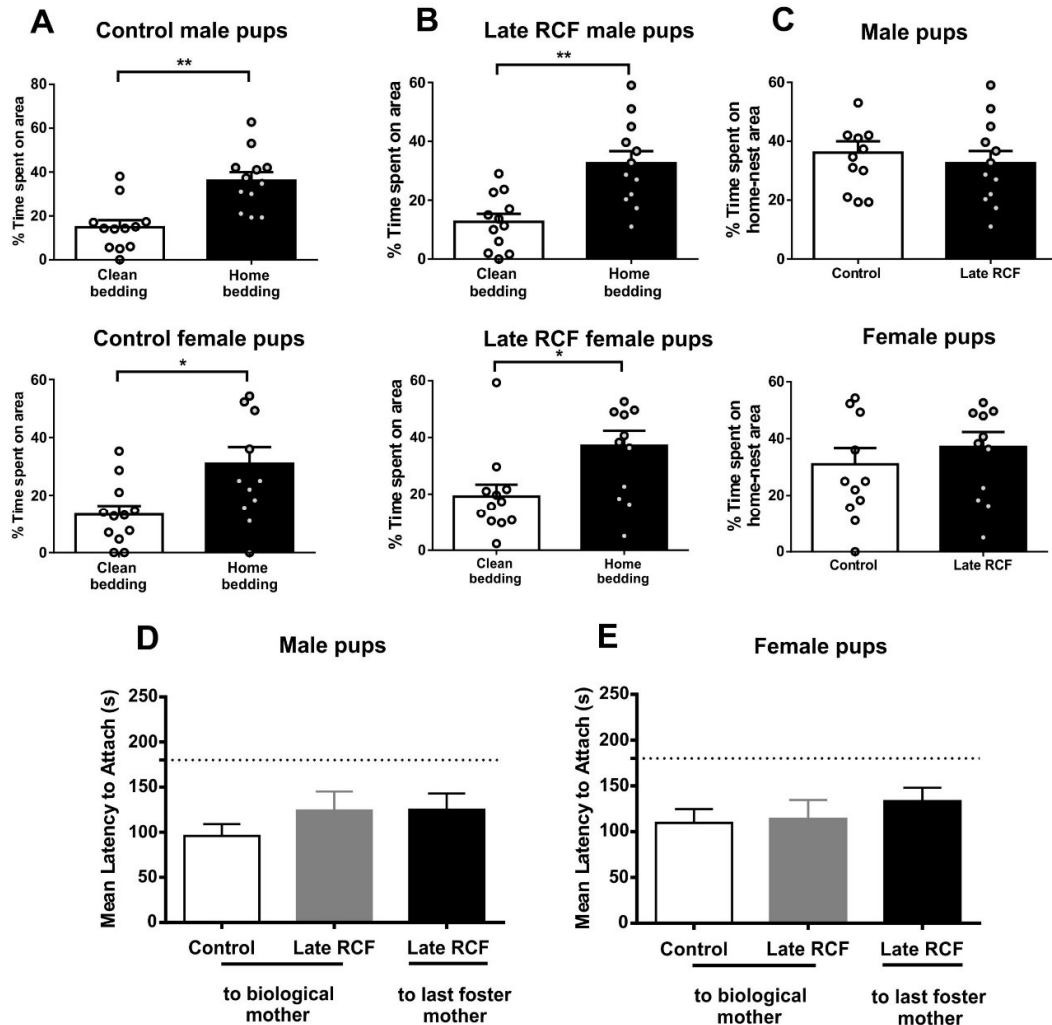
### 3.6 EFFECT OF LATE RCF ON THE OLFACTORY PREFERENCE OF PUPS FROM RATS AT PND 15

#### 3.6.1 Biological or adoptive mother nest-odor vs clean bedding

In the olfactory preference test, pups from the control and late RCF groups were equally responsive. In the control group, 100% of males (12 of 12 tested) and 91.66% of female's pups (11 of 12 tested) were responsive. Similarly, in the RCF group, 100% of male and female pups (12 of 12 tested) actively responded at least to one of the stimuli in the Y-maze.

Figure 5 shows that pups from both groups showed a significant olfactory preference for the biological or adoptive mother nest odor. Male pups from the control group spent significantly more time in the area of their own-nest bedding in relation to the clean bedding [own-nest bedding: mean  $36.12 \pm 3.84$  vs clean bedding: mean  $14.86 \pm 3.15$ ;  $t(11) = 3.96$ ,  $p = 0.0022$ ; paired Student's  $t$ -test] (Figure 5 A, above). A similar result was observed for female pups from the control group [Adoptive mother nest material: mean  $31.03 \pm 5.71$  vs. clean bedding: mean  $13.22 \pm 3.11$ ;  $t(11) = 2.96$ ,  $p = 0.0013$ ; paired Student's  $t$ -test] (Figure 5 A, below). Similarly, male [own-nest material: mean  $32.53 \pm 4.14$  vs. clean bedding: mean  $12.67 \pm 2.69$ ;  $t(11) = 3.70$ ;  $p = 0.0035$ , paired Student's  $t$ -test] (Figure 5 B, above) and female pups [own-nest material: mean  $37.11 \pm 5.21$  vs. clean bedding: mean  $19.19 \pm 4.18$ ,  $t(11) = 2.56$ ,  $p = 0.0263$ , paired Student's  $t$ -test] (Figure 5 B, below) from late RCF group spent significantly more time over their own-nest material area than over clean bedding area.

Male pups from the late RCF group spent similar time over the home-bedding area as male pups from the control group [late RCF:  $32.53 \pm 4.14$  vs. Control:  $36.12 \pm 3.84$ ;  $t(22) = 0.64$ ,  $p = 0.53$ ,  $n = 12$ , unpaired Student's  $t$ -test] (Figure 5 C, above). Similarly, female pups from the early RCF group spent similar time over the home-bedding area as female pups from control pups [late RCF:  $37.11 \pm 5.28$  vs. Control:  $31.03 \pm 5.72$ ,  $t(22) = 0.78$ ,  $p = 0.44$ ,  $n = 12$ , unpaired Student's  $t$ -test] (Figure 5 C, below).



**Figure 5.** Late cross-fostering has no effects on olfactory preference on home bedding on postnatal day 15 or on nipple attachment on postnatal day 16. (A) Comparison of percentage of time over the area of home bedding odor of male (above) and female pups (below) from control group. (B) Comparison of percentage over the area of home bedding odor (corresponding to the last foster mother) of male (above) and female pups (below) from late RCF group. (C) Comparison of percentage of time over the area of home bedding odor between control and late RCF group male (above) and female pups (below). Comparison of the latency to attach to biological or last foster mother's nipple in male (D) a female pups (E) from control and late RCF group. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  clean bedding vs home bedding. For all group  $n=12$  pups. RCF: repeated cross-fostering group.

### 3.6.2 GD 20 Biological mother nest-odor vs clean bedding.

At PND 15, 22 pups from the late RCF group (10 males and 12 females from 24 tested) were responsive to at least one of the stimuli in the Y-maze test. Table 3 shows that female pups from the control group spent significantly more time over the

pregnant rat's bedding area than in the clean bedding area. Male and female pups from the late RCF group showed no significant difference in their time spent over the clean bedding or over the pregnant rat's bedding area.

### **3.6.3 Predator odor vs clean bedding**

We also evaluated avoidance response to predator odor in control and late RCF pups at PND 15. Approximately 83% of the male offspring (10 of 12 tested) and 75% of the females (9 of 12 tested) of the control group were responsive to the odors presented (sand with cat urine or clean bedding). In the late RCF group, 58% of male pups (7 of 12 tested) and 66% of female pups (8 of 12 tested) were responsive. Table 3 shows that male and female pups from the control group spent more time in the clean bedding area than in the cat urine area. Similarly, male and female pups from the late RCF group also spent more time in the clean bedding area than in the cat urine sand area, although without statistical significance.

### **3.6.4 Effect of late RCF on nipple attachment of rat pups**

In PND 16, the latency to reach the nipple of lactating females was evaluated. The following tests were performed: Control group pups were tested to attach to their biological mother, and pups from the late RCF group were tested to attach to their biological and to their last adoptive mother. Figures 5 D-E show that male and female pups from the late RCF group show a similar mean latency to attach to their biological or their last adoptive mother [Male pups: biological mother:  $124.1 \pm 21.24$  vs. last adoptive mother:  $124.8 \pm 18.26$ ;  $t(22) = 0.024$ ,  $p = 0.98$ . Female pups: biological mother:  $114.2 \pm 20.46$  vs last adoptive mother  $133.5 \pm 14.57$ ;  $t(22) = 0.76$ ,  $p = 0.45$ , unpaired Student's  $t$ -test]. Male pups from the late RCF group showed no significant difference in their latency to attach to their biological mother [Control:  $95.90 \pm 13.14$  vs. late RCF:  $124.20 \pm 21.24$ ;  $t(22) = 1.13$ ,  $p = 0.27$ , unpaired Student's  $t$ -test] or their last adoptive mother compared with the latency to attach in the control group [Control:  $95.90 \pm 13.14$  vs late RCF group to last adoptive mother:  $124.8 \pm 18.26$ ;  $t(22) = 1.29$ ,  $p = 0.212$ , unpaired Student's  $t$ -test] (Figure 5 D). Similarly, female pups from the late RCF group showed no difference in their latency to attach to their biological mother



[Control:  $109.7 \pm 14.98$  vs. late RCF group:  $114.2 \pm 20.46$ ;  $t(22) = 0.178$ ,  $p = 0.86$ , unpaired Student's  $t$ -test] or their last adoptive mother compared with the latency to attach in the control group [Control:  $109.7 \pm 14.98$  vs late RCF group:  $133.5 \pm 14.57$ ;  $t(22) = 1.139$ ,  $p = 0.267$ , unpaired Student's  $t$ -test] (Figure 5 E).

## 4 DISCUSSION

This study analyzes the effects of RCF of lactating females on the formation of rat-mother attachment in two important periods of postnatal development: sensitive and postsensitive periods for attachment learning. The hypothesis of this research was that the RCF of caregiving lactating females, performed in the first days of the pup's life (PND 1-3), changes the neonatal environment of the pups, compromising the formation of mother-infant attachment, while RCF in the transition period from the attachment sensitive period to the postsensitive attachment (PND 9-11), although it alters environmental stability, is no longer able to affect the formation of mother-infant attachment, since this bonding is already established. Here, we provide the first evidence that RCF during the sensitive period for infant attachment learning reduces the daily maternal care behavior toward the pups and delays the developmental behavioral response to maternal odor and other biologically relevant odors. On the other hand, the RCF procedure during the postsensitive period for infant attachment slightly reduces the daily maternal care toward older pups, and although it did not alter the behavioral response to maternal odor, the response to other biologically relevant odors was altered.

### 4.1 EFFECTS OF RCF ON MATERNAL CARE AND MATERNAL MOTIVATION

Our results show that the RCF procedure performed during the first postpartum days significantly alters the maternal nursing behavior pattern toward the pups. Specifically, reducing high crouch posture and increasing low crouch posture. Furthermore, the maternal motivation to retrieve the pups was significantly altered during those days. These effects were restricted to the second and third day of the

RCF procedure, and after the mothers were allowed to care their adoptive pups without any disturbance, the maternal behavior recovered to control levels. Interestingly, the first day of the RCF procedure (one day after delivery) did not alter the total nursing behavior of the adoptive mothers, suggesting that in this day, maternal behavior is quite stable and less sensitive to environmental influences. Other studies using the same protocol have reported no significant effects on the maternal behavior pattern during or after the days of RCF procedure (D'Amato et al., 2011; Luchetti et al., 2015). This discrepancy is likely due to differences in the protocol of maternal behavior observation. D'Amato and Luchetti recorded in two daily sessions of 30 min each, while in our protocol, maternal behavior was recorded in four daily sessions of 72 min each. Another possible explanation for the discrepancy could be the implementation of the RCF protocol itself. In the protocol of D'Amato and Luchetti, the pups are scattered over the floor of the foster dam cage and then immediately covered with the foster nest bedding. In our procedure, we did not cover the pups with foster mother bedding, possibly the odor of the alien pups was an important factor to rapidly display any maternal behavior toward the pups.

High crouch posture is considered an active nursing posture the lactating rats perform mostly during the early postpartum days, and this gradually decreases as the pups grow older (Cramer & Alberts, 1990). The dams perform this nursing posture stimulated by the pups, which bouts the mother's ventrum to access her nipple. In our study, during the days in which this repertoire was high, the RCF mother was observed mostly outside the nest, suggesting that this active nursing posture was reduced because the mother was absent from the nest. Interestingly, after the procedure was end, the frequency of this posture increased similarly to the control dams, but the less active low crouch posture increased.

This suggests that the RCF procedure on the early postpartum day significantly interrupts maternal behavior. The procedure removing the mother from her nest, replacing her pups from another litter and scattering over the floor of her nest seems to create a stressed environment for pair mother-infant, reducing the opportunity for the mother-infant interaction and the loss of other hidden functions (Hofer, 1984) important for pup's development. Consistent with the idea that the RCF procedure was a stressful situation, we found an increased score in self-grooming behavior during and after the days of the RCF procedure. It has been proposed that

self-grooming is an important adaptive behavior that rats display in stressful situations to reduce anxiety and that lactating female rats exhibit increased self-grooming behavior when they are exposed to stressed environments (Nephew & Bridges, 2011). This suggests that the RCF protocol in our study was an important stressor for the dam that spent more time exploring the cage and less time caring the pups.

During the early postpartum day, the lactating rats have an increased motivation to retrieve the pups, and this motivation is stimulated by the pup's stimuli (Numan & Woodside, 2010; Olazábal et al., 2013). Using the pup-retrieval test, we assessed the motivation to retrieve the pups in control and RCF dams. The test was performed in the same dam's residence cage and consisted in that the RCF and control females recovered their own or foster pups. Immediately after the RCF procedure, the pups were placed on the floor of the home cage, and then the dam was placed. We observed the latency for the dam to retrieve the first 5 pups. In this condition, the RCF dams show a increased latency to retrieve the pups and group them before display any nursing posture. Mother rats use the odor and ultravocalizations of their pups as a cue to retrieve them to the nest (Brouette-Lahlou et al., 1991; Moore & Samonte, 1986), and another study has shown that mice pups exposed to the RCF procedure during PND 1-4 show increased ultravocalizations compared with control pups or handled pups (Luchetti et al., 2015). This suggests that the prolonged time to retrieve the pups that we observed during the RCF procedure might reflect the reduced responsiveness for the pup's stimuli, possibly mediated by odor. This idea is consistent with Farrell and Alberts, who have suggested that lactating rats with 6-8 PND pups use the pup's odor as a cue to respond to a vocalizing pup (Farrell & Alberts, 2002). However, the RCF protocol causes stress to both mothers and offspring, so it is difficult to determine whether maternal behaviors are altered by changes in the pups' behaviors relative to the mother or if the mother changes her own behavior due to possible hormonal changes related to the stress that the intervention causes. More studies need to be performed to elucidate these issues.

Maternal nursing behavior naturally reduces as the pups become older, gain better motor control and explore the cage (Thiels, Alberts, & Cramer, 1990). For example, at PND 10, high postures nursing events reduced almost 50% since PND 1; however, passive nursing posture eventually increased in those days, and the mother spent less time licking the pups and spent more time outside the nest exploring the

cage along with the pups. The RCF procedure performed during this period (PND 9-11) slightly alters maternal behavior care. Only during the first day did we observed a significant alteration in total nursing care toward the pups. Although the next days of the RCF procedure, we did not find important variation in the total nursing behavior, we observed interesting variations in specific nursing postures. Specifically, we observed an increase in high crouch and high crouch-licking posture and a reducing score in supine nursing posture. These effects were observed during the period of the RCF procedure, and the effects on the high crouch posture continued to be observed after the RCF procedure was finished. Maternal behavior reflects the dynamic interactions between a nursing female caregiver and her offspring (Rilling & Young, 2014), so if cross-fostering occurs, it is possible that the characteristics of the adopted pups alter the behavior of the adoptive mother or that the maternal environment has a considerable impact on the offspring (Yamamuro, 2008).

In our study, we showed that repeated cross-fostering in the sensitive period for attachment learning reduces maternal behavior in relation to the pups in the first postpartum days and reduces the olfactory responses of the pups to the maternal odor and to other relevant odors. However, RCF in the postsensitive period of attachment learning has little impact on maternal behavior, altering only the first day of care in relation to older pups, and does not alter olfactory preference responses for maternal odor but undermines responses to other relevant odors in this phase of transition from dependence on maternal care to independent living.

#### 4.2 EARLY RCF ALTERS OLFACTORY BEHAVIOR RESPONSE TO THE HOME-NEST ODOR

Our results demonstrate that the repeated exchange of lactating female caregivers alters the process of establishing the mother-infant relationship of developing rats. During the first postpartum period (characterized as the learning attachment period), the repeated exchange of lactating female caregivers abolished the acquisition olfactory preference for the odor of the last adoptive mother (Figures 3B-C) and for the odor of the biological mother (Table 3) analyzed in the PND 7.

The pup's attachment to its mother can be operationally defined as the orientation and approach behavior the pup displays for the mother's scent and the odors associated with it. This behavior is expressed and can be measured by the olfactory preference responses of the pup to the odor of the mother in tests of two choices as presented in this paper. This initial olfactory preference of the pup is formed during interactions with the mother in the nest through associative learning processes and occurs in a time window for its formation, called the attachment sensitive period (Debiec & Sullivan, 2017; Opendak et al., 2017), which corresponds to the first 10 days of a rat's life. This learning is also strongly dependent on the behavioral repertoires that the mother directs to the pup and on the responsiveness of the pup's nervous system to maternal tactile stimuli.

Data from the present study suggest that although lactating females remained with offspring exhibiting a stable behavioral repertoire on PND 4, on PND 2 and 3, they had a significant change in maternal behavior, which was reestablished immediately after the end of the intervention. Thus, the changes of mothers performed in the first days of the pups' postnatal development signified a change in the important neonatal environment that impacted the formation of the mother-child attachment.

The work of Professor Regina Sullivan's laboratory suggests that the mother-infant attachment is formed through the temporal association of maternal odor and mother's tactile stimulation (licking) the offspring. The pairing of these two stimuli is quickly learned by pups and results in search behavior and approach to conditioned odor. From this learning process, the maternal odor assumes the ability to regulate the physiological processes and behaviors of the pups (Al Aïn et al., 2017; Debiec & Sullivan, 2017; Polan & Hofer, 1998; Sullivan et al., 1986).

In this study, the adopted pups were exposed to maternal stimuli from 4 different mothers, a condition that may have negatively interfered in the formation of the mother-infant attachment in PND 7. The changes in maternal information, both olfactory, gustatory, tactile and thermal, caused by the RCF procedure probably disrupted the associative learning process necessary to establish the link between the adoptive mother and the developing infant (Landers & Sullivan, 2012; Luchetti et al., 2015). In addition, instability in the postnatal environment induced by RCF also interfered with the ability of the adopted pups to seek and approach the mother's nipple in PND 8 (Figure 3 D-E) to suckle, but this reduced capacity did not affect the body

weight gain of the pups, which on average was the same as the pups that remained with their biological mothers.

Leon (1992) described that the origin of the pup's attraction to the mother's odor is in the feces of the lactating rat, since the pup prefers the feces of a lactating rat when compared to the feces of a non-lactating rat. The reason for that preference is presence of cecotrope, which is extremely attractive to the pups. Cecotrope is produced in the cecum of all adult rats, however, only lactating rats are able to excrete enough cecotrope to attract the pups (Leon, 1974; Leon, 1992). Most likely, this is due to the increase in feed consumption during lactation (Leon, 1975). In addition to dietary intake, other factors, such as hormonal, act to regulate excretion of cecotrope by lactating rats (Leon, 1974). In present study, the odor of females on GD 20 was used to evaluate the behavior of the offspring in response to the odor of their biological mother after being submitted to the RCF protocol. However, results did not confirm our hypothesis, since pups did not show preference for the GD20 bedding of their mother. Considering that cecotrope increases after delivery, it is possible that the amount of maternal odor on the stimuli used was low. Another possible reason for the absence of preference could be the reduction in odoriferous molecules during the time of conservation of the material used as stimuli (sawdust and feces).

In short, the total nursing in RCF dams reduces importantly compared to control dams and also reduced maternal motivation. The behavioral olfactory preference to foster mother nest material was also reduced, and the latency to attach the mother's nipples was delayed. This period has been proposed as a sensitive period to learn attachment to the mother, which is acquired in interaction with the mother into the nest. Therefore, the repertoire of the mother is important and the rhythmicity of how this behavior is expressed to the pups. The mother rats display a rhythmic maternal behavior repertory. Most nursing postures were observed in the first session of the day (9h00) and gradually reduced at the final session (18h00) when the mother displayed behavior outside the nest (nest building, self-grooming). In supporting the associative learning that occurs in the nest, the constant and repetitive pairing of maternal and nest odor with maternal behavior repertoires is probably critical instead of the quantity of maternal behavior. The absence of the mother may reduce the opportunity to provide stimuli to the pups (warm, licking, skin contact) and reduce the opportunity for these stimuli to be paired with the maternal odor or the nest. In addition, the reduced

maternal stimulation might reduce the pup's arousal, which has been proposed that the maternal stimuli trigger the noradrenaline system in the pups, which is necessary to form the association of odor with maternal behavior contingencies (Debiec & Sullivan, 2017; Opendak & Sullivan, 2016).

#### 4.3 LATE RCF DOES NOT ALTER THE OLFACTORY BEHAVIOR RESPONSE TO THE HOME-NEST ODOR

We also evaluated the behavioral responses of the offspring that were submitted to the RCF protocol during the transitional sensitive period for the postsensitive period, and our results show that repeated cross-fostering of caregiving female animals during PND 9-11 does not interfere with responses (Figures 5 B-C) and does not affect the search behavior and approach to odor of the biological mother (Table 3). It is important to note that the last lactating female caregivers remained with the offspring adopted in the PND 12-15 period and the biological mothers had the litters before the RCF protocol, that is, in the PND period 1-9. Pups who were adopted late also sought the nipple of both the adoptive mother and the biological mother in the PND 16 to suckle. In addition, the body weight gain of the adopted pups is on average the same as the pups that remained with their biological mothers and never went through any environmental intervention. These data suggest that RCF during the transition from the sensitive to postsensitive period does not alter the behaviors required by the pups to ensure their survival.

The mother's odor is critical for the survival of rat pups, as it is through it that the pup seeks and approaches the mother to protect itself, warm up and feed itself. In addition, the maternal odor also regulates mother-infant interactions early in life, when attachment learning is fully favored and aversive learning is attenuated to prevent pups from avoiding their caregiver (Rainekei et. al., 2010; Perry, Al Ain et al., 2016; Debiec & Sullivan, 2017). It is noteworthy that the mother's odor has special control over the pups in the postnatal period 10 to 15. Specifically, at this age, the pups are crossing the transitional sensitive period, in which the maternal stimuli have the unique ability to prevent the learning of threats through suppression of amygdala activity mediated by the presence of the mother in the nest (Debiec & Sullivan, 2017; Opendak &

Sullivan, 2016; Sullivan & Holman, 2010; Upton and Sullivan, 2010). Therefore, it is not uncommon for our results to show a strong olfactory preference for the odor of the adoptive and biological mother of the offspring who were submitted to the RCF protocol or by the biological mother of the control pups on day PND 15 of the postsensitive period.

#### 4.4 RCF PERFORMED DURING THE ATTACHMENT SENSITIVE AND POSTSENSITIVE PERIODS DOES NOT ALTER AVOIDANCE BEHAVIOR TOWARD BIOLOGICALLY AVERSIVE ODORS

Finally, this study also analyzed the effect of repeated exchange of lactating female caregivers on the olfactory preference-inhibition system through approach and/or avoidance responses to a naturally aversive stimulus (predator odor) on PND 7 and 15. The analysis of the responses showed that both control and adopted pups suppress predator odor approaching behavior (Table 3) in the two periods studied. The odor guides the approach and avoidance behaviors that begin at birth in many mammals, including humans (Al Aïn et al., 2017; Moriceau, 2004). Olfactory cues are essential for newborn rodents to approach the mother and attach to the nipples and to suppress the ultrasonic vocalizations in the presence of a predator (Perry et al., 2016; Takahashi, 1992). In rat pups, the odor of an adult male rat is an aversive odor, as inferred by the fact that it interrupts ultrasonic vocalizations during the first days of life and causes immobility/freezing in older pups from PND 10 (Hofer et al., 2002; Moriceau, 2004; Perry et al., 2016; Takahashi, 1992). Our results show behavioral avoidance responses to a biologically aversive odor already in pups at 7 days of postnatal life. It is important to note that none of the tested animals had experience with this type of odor.

Finally, we can conclude that RCF by caregiving lactating females during the attachment sensitive period alters the olfactory preference for the maternal odor of in rat pups at PND 7. This olfactory learning is necessary for the formation of attachment mother-pup during the attachment sensitive period; however, once this learning is consolidated, RCF by caregiving nursing females does not cause further damage to the olfactory learning that is necessary for the survival of the pups. We can also



conclude that this environmental intervention does not interfere with the ability of lactating females to care for offspring other than their biological ones. Together, these results suggest that the same postnatal environmental intervention (cross-fostering) at different times in development may induce different or even opposing effects on maternal and filial behavioral characteristics.

## 5 REFERENCES

- Al Aïn, S., Perry, R. E., Nuñez, B., Kayser, K., Hochman, C., Brehman, E., ... Sullivan, R. M. (2017). Neurobehavioral assessment of maternal odor in developing rat pups: implications for social buffering. *Social Neuroscience*, 12(1), 32–49. <https://doi.org/10.1080/17470919.2016.1159605>
- Bartolomucci, A., Gioiosa, L., Chirieleison, A., Ceresini, G., Parmigiani, S., & Palanza, P. (2004). Cross fostering in mice: Behavioral and physiological carry-over effects in adulthood. *Genes, Brain and Behavior*, 3(2), 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2003.00059.x>
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., & Chanel, J. (1991). Is rat dam licking behavior regulated by pups' preputial gland secretion? *Anim Learn Behav*, 19, 177–184.
- Bruce, J., Tarullo, A. R., & Gunnar, M. R. (2009). Disinhibited social behavior among internationally adopted children. *Development and Psychopathology*, 21(01), 157–171. <https://doi.org/10.1017/S0954579409000108>
- Callaghan, B. L., Sullivan, R. M., Howell, B., & Tottenham, N. (2014). The international society for developmental psychobiology Sackler symposium: Early adversity and the maturation of emotion circuits-A cross-species analysis. *Developmental Psychobiology*, 56(8), 1635–1650. <https://doi.org/10.1002/dev.21260>
- Cramer, C. P., & Alberts, J. R. (1990). Weaning in Rats : I . Maternal Behavior, 23(July 1989), 479–493.
- Crispim Junior, C. F., Pederiva, C. N., Bose, R. C., Garcia, V. A., Lino-de-Oliveira, C., & Marino-Neto, J. (2012). ETHOWATCHER: Validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Computers in Biology and Medicine*, 42(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2011.12.002>
- D'Amato, F. R., Zanettini, C., Lampis, V., Coccorello, R., Pascucci, T., Ventura, R., ... Battaglia, M. (2011). Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO2 sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS ONE*, 6(4), 2–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018637>
- Debiec, J., & Sullivan, R. M. (2017). The neurobiology of safety and threat learning in infancy. *Neurobiology of Learning and Memory*, 143, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.10.015>
- Di Segni, M., Andolina, D., Luchetti, A., Babicola, L., D'Apolito, L. I., Pascucci, T., ... Ventura, R. (2015). Unstable Maternal Environment Affects Stress Response in Adult Mice in a Genotype-Dependent Manner. *Cerebral Cortex*, 26(11), 4370–4380. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv204>
- Farrell, W. J., & Alberts, J. R. (2002). Stimulus control of maternal responsiveness to Norway rat (*Rattus norvegicus*) pup ultrasonic vocalizations. *Journal of Comparative Psychology*, 116(3), 297–307. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.116.3.297>
- Hofer, M. A. (1984). Relationships as regulators: a psychobiologic perspective on bereavement.

- Psychosomatic Medicine*, 46(3), 183–197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6739679>
- Hofer, M. A., Shair, H. N., & Brunelli, S. A. (2002). Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. *Current Protocols in Neuroscience*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>
- Kojima, S., & Alberts, J. R. (2009). Maternal care can rapidly induce an odor-guided huddling preference in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 51(1), 95–105. <https://doi.org/10.1002/dev.20349>
- Landers, M. S., & Sullivan, R. M. (2012). The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Developmental Neuroscience*, 34(2–3), 101–114. <https://doi.org/10.1159/000336732>
- Leon, M. (1974). Maternal pheromone. *Physiology & Behavior*, 13, 441–453.
- Leon, M. (1975). Dietary control of maternal pheromone in the lactating rat. *Physiology & Behavior*, 14(3), 311–319. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(75\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90039-6)
- Leon, M. (1992). Neuroethology of olfactory preference development. *Journal of Neurobiology*, 23(10), 1557–1573. <https://doi.org/10.1002/neu.480231012>
- Luchetti, A., Oddi, D., Lampis, V., Centofante, E., Felsani, A., Battaglia, M., & D'Amato, F. R. (2015). Early handling and repeated cross-fostering have opposite effect on mouse emotionality. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(4), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00093>
- Meyer, P. M., & Alberts, J. R. (2016). Non-nutritive, thermotactile cues induce odor preference in infant mice (*Mus musculus*). *Journal of Comparative Psychology*, 130(4), 369–379. <https://doi.org/10.1037/com0000044>
- Moore, C. L., & Samonte, B. R. (1986). Preputial glands of infant rats (*Rattus norvegicus*) provide chemosignals for maternal discrimination of sex. *J Comp Psychol*, 100, 76–80.
- Moriceau, S. (2004). Unique Neural Circuitry for Neonatal Olfactory Learning. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1182–1189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4578-03.2004>
- Moriceau, S., Roth, T. L., & Sullivan, R. M. (2010). Rodent model of infant attachment learning and stress. *Developmental Psychobiology*, 52(7), 651–660. <https://doi.org/10.1002/dev.20482>
- Nephew, B. C., & Bridges, R. S. (2011). Effects of chronic social stress during lactation on maternal behavior and growth in rats. *Stress*, 14(6), 677–684. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.605487>
- Numan, M., & Woodside, B. (2010). Maternity: Neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. *Behavioral Neuroscience*, 124(6), 715–741. <https://doi.org/10.1037/a0021548>
- Olazábal, D. E., Pereira, M., Agrati, D., Ferreira, A., Fleming, A. S., González-Mariscal, G., ... Uriarte, N. (2013). New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1860–1874. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.003>
- Opendak, M., Gould, E., & Sullivan, R. M. (2017). Early life adversity during the infant sensitive period for attachment: Programming of behavioral neurobiology of threat processing and social behavior. *Accident Analysis and Prevention*. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2017.02.002>
- Opendak, M., & Sullivan, R. M. (2016). Unique neurobiology during the sensitive period for attachment produces distinctive infant trauma processing. *European Journal of Psychotraumatology*, 7(11), 31276. <https://doi.org/10.3402/ejpt.v7.31276>
- Pardo, G. V. E., Goularte, J. F., Hoefel, A. L., de Castro, A. L., Kucharski, L. C., da Rosa Araujo, A. S., & Lucion, A. B. (2016). Effects of sleep restriction during pregnancy on the mother and fetuses in rats. *Physiology & Behavior*, 155, 66–76.

- <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.11.037>
- Perry, R. E., Al Aïn, S., Rainecki, C., Sullivan, R. M., & Wilson, D. a. (2016). Development of Odor Hedonics: Experience-Dependent Ontogeny of Circuits Supporting Maternal and Predator Odor Responses in Rats. *Journal of Neuroscience*, 36(25), 6634–6650. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0632-16.2016>
- Polan, H. J., & Hofer, M. A. (1998). Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Developmental Psychobiology*, 33(1), 5–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199807\)33:1<5::AID-DEV2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199807)33:1<5::AID-DEV2>3.0.CO;2-P)
- Rainecki, C., Moriceau, S., & Sullivan, R. M. (2010). Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biological Psychiatry*, 67(12), 1137–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.019>
- Rainecki, C., Pickenhagen, A., Roth, T. L., Babstock, D. M., McLean, J. H., Harley, C. W., ... Sullivan, R. M. (2010). The neurobiology of infant maternal odor learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(10), 914–919. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>
- Rilling, J. K., & Young, L. J. (2014). The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science*, 345(6198), 771–776. <https://doi.org/10.1126/science.1252723>
- Sullivan, R. M. (2003). Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008(3), 122–131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998878>
- Sullivan, R. M., & Holman, J. (2010). Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: the role of corticosterone. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 835–844. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.11.010>
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., Ravel, N., & Mouly, A.-M. (2015). Olfactory memory networks : from emotional learning to social behaviors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(2), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00036>
- Sullivan, R M, & Wilson, D. A. (1991). The role of norepinephrine in the expression of learned olfactory neurobehavioral responses in infant rats. *Psychobiology (Austin, Tex.)*, 19(4), 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The
- Sullivan, R. M., Hofer, M. A., & Brake, S. C. (1986). Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Developmental Psychobiology*, 19(6), 615–623. <https://doi.org/10.1002/dev.420190612>
- Takahashi, L. K. (1992). Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. *Physiology and Behavior*, 52(3), 493–498. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90336-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90336-Z)
- Thiels, E., Alberts, J. R., & Cramer, C. P. (1990). Weaning in rats: II. Pup behavior patterns. *Developmental Psychobiology*, 23(6), 495–510. <https://doi.org/10.1002/dev.420230605>
- Upton, K. J., & Sullivan, R. M. (2010). Defining age limits of the sensitive period for attachment learning in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 52(5), 453–464. <https://doi.org/10.1002/dev.20448>
- Yamamuro, Y. (2008). Maternal Environment Alters Social Interactive Traits But Not Open-Field Behavior in Fischer 344 Rats. *Experimental Animals*, 57(5), 439–446. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.439>

## CAPÍTULO IV

### 4. DISCUSSÃO GERAL

No primeiro estudo desta tese, apresentado no capítulo 2, exploramos o desenvolvimento das respostas comportamentais para odores biologicamente relevantes durante as três primeiras semanas do período pós-natal de filhotes de ratos e caracterizamos o perfil do comportamento maternal durante esse período. Primeiramente, avaliamos as respostas comportamentais ao próprio odor de ninho e ao odor de ninho de rato juvenil em filhotes machos e fêmeas nos dias DPN 3, 7, 11 e 15. Procuramos determinar o momento em que os filhotes mostram preferência para o odor do próprio ninho e para o odor de ninho de rato juvenil em relação a um odor neutro. Até onde sabemos, as respostas ao odor do ninho de rato juvenil não foram estudadas em filhotes de ratos. A seguir, avaliamos as respostas ao odor de ninho de rato adulto e para urina de gato também nos DPN 3, 7, 11 e 15 para identificar quando os filhotes mostram aversão ao odor de ninho de rato adulto e odor de predador em relação a um odor neutro. Por fim, avaliamos o comportamento materno nos dias DPP 2, 6, 10 e 14 para identificar quais características do comportamento materno que contribuiriam para o desenvolvimento normal da prole.

Nossos resultados mostraram que as respostas de preferência olfatória para o odor do próprio ninho; para o odor de ratos juvenis; e para o odor de ratos machos adultos foram evidentes a partir do DPN 7 e não antes. Embora tenhamos observado que as respostas se mantiveram sem mudanças entre o DPN 7 e 11, os filhotes com DPN 15 apresentaram um aumento na preferência olfatória para o odor do ninho e para o odor de ratos machos. Para o odor de congêneres a preferência se manteve estável entre os dias DPN 7 e DPN 15. E para um odor de predador os filhotes de ratos apresentaram respostas de evitação a partir do DPN 11, não antes. Paralelamente com o aparecimento dessas respostas comportamentais dos infantes para os odores biologicamente relevantes nós também mostramos que o repertório de comportamentos materno é intenso durante a primeira semana pós-natal, onde a postura de *high crouch* e *licking* foram significativamente maiores e à medida que o período pós-natal avança os comportamentos maternos diminuem e gradualmente

outros comportamentos aumentam como por exemplo a *supine posture* e também o número de vezes que a mãe sai do ninho (*dam off the nest*).

O aprendizado do odor da mãe e do ninho é coincidente com o período no qual o cuidado materno é intenso, ao qual o filhote está exposto dentro do ninho. Enquanto que, o aprendizado de preferência por congêneres ocorre em uma janela temporal maior. Possivelmente, certos padrões de comportamento materno após o dia pós-natal 10 sejam importantes para induzir essas preferências. Kojima e Alberts (2009) sugeriram que as experiências com a mãe dentro do ninho, tanto antes como depois do dia pós-natal 10 são capazes de induzir respostas comportamentais de preferências para os congêneres.

Além dessa caracterização inicial, esta tese teve como foco principal estudar, do ponto de vista experimental, os efeitos comportamentais da adoção de ratas lactantes cuidadoras sobre a formação do vínculo (apego) mãe-filhote em dois períodos importantes do desenvolvimento pós-natal: durante o período sensível e no período pós-sensível a aprendizagem de apego. Uma de nossas hipóteses era que a troca repetida de fêmeas lactantes cuidadoras (adoção cruzada) realizada nos primeiros dias após o nascimento dos filhotes (DPN 1 a 3) comprometeria a formação do vínculo mãe-filhote, enquanto que a adoção realizada mais tardiamente (DPN 9 a 11), embora altere a estabilidade ambiental, não seria mais capaz de afetar a formação do apego mãe-filhote, uma vez que esse vínculo já está estabelecido. De outro lado, a troca repetida de filhotes, embora de mesma idade, afetaria negativamente o comportamento de cuidado materno para os filhotes que não fossem os seus biologicamente. Em essência, o estudo analisou a especificidade da relação mãe-filhote, ou seja, se haveria uma certa identidade específica dos estímulos dos filhotes e da mãe, de forma recíproca.

Esta tese forneceu evidências de que a adoção cruzada realizada durante o período sensível para a aprendizagem do apego do filhote pela fêmea cuidadora lactante reduziu o comportamento de cuidado materno diário, especificamente nos dias pós-natal 2 e 3. Essa redução no cuidado maternal foi observada durante o período em que o protocolo de RCF estava sendo realizado, no entanto, imediatamente após o término do RCF, ou seja, a partir do dia 4 pós-natal, as mães estabilizaram o cuidado maternal em relação aos filhotes adotados. Além disso, este estudo mostrou que a adoção atrasou o desenvolvimento da resposta comportamental ao odor materno e a outros odores biologicamente relevantes, confirmando a hipótese

de que a adoção realizada no período sensível ao apego compromete a formação do vínculo mãe-filhote.

Por outro lado, o procedimento de adoção tardia realizado durante o período de transição do sensível para o pós-sensível ao apego não interferiu nas respostas de busca e aproximação dos filhotes ao odor da última mãe adotiva. No entanto, os filhotes adotados tardiamente não mostraram comportamentos de preferência para o odor da mãe biológica (odor da mãe biológica na condição de gestante). Nossa expectativa era de que os filhotes pudessem expressar a memória de sua mãe biológica. Uma explicação alternativa para esse resultado é de que o odor materno utilizado como estímulos (maravalha e fezes) possa ter sido fraco para desencadear o comportamento de aproximação dos filhotes. Com o armazenamento relativamente prolongado, os odores da mãe presentes no material podem ter se dissipado. Outra possibilidade também relacionada à densidade do odor presente no estímulo utilizado é o fato de que as fezes das fêmeas gestantes têm menos cecótopos (onde se encontra o odor) do que das fêmeas lactantes. Assim, não podemos afirmar que procedimento de RCF realizado durante o período pós-sensível ao apego tenha interferido na preferência pelo odor da mãe biológica. Com relação ao comportamento maternal, a adoção tardia reduziu o cuidado materno diário, em relação aos filhotes mais velhos, especificamente no dia 9 pós-natal. Esse resultado confirma a hipótese inicial de que a troca repetida de filhotes, embora de mesma idade, afetaria negativamente o comportamento de cuidado materno para os filhotes que não fossem os seus biologicamente.

Nos próximos itens, discutimos mais detalhadas os resultados obtidos nesta tese.

#### 4.1 EFEITOS DO RCF PRECOCE SOBRE O CUIDADO E A MOTIVAÇÃO MATERNA

O modelo de adoção realizado através da troca repetida de fêmeas lactantes durante o período sensível para a aprendizagem de apego reduziu o comportamento materno em relação aos filhotes nos dias 2 e 3 pós-natal. A postura de agachamento com dorso elevado é considerada uma postura de amamentação ativa que as fêmeas lactantes realizam com alta frequência, principalmente durante os primeiros dias do pós-parto, e esse comportamento diminui naturalmente à medida que a idade dos

filhotes avança (Cramer & Alberts, 1990). Em nosso estudo, durante os dias em que esse repertório de comportamento materno foi alto, as mães submetidas ao protocolo de RCF foram observadas principalmente fora do ninho, indicando que a postura de amamentação com dorso elevado (*high crouch*) foi reduzida, uma vez que elas estavam ausente do ninho. Curiosamente, após o término do procedimento de RCF, a frequência da postura de amamentação com dorso elevado aumentou de forma semelhante às mães do grupo controle.

As mães realizam essa postura de amamentação incentivadas pelos filhotes, que estimulam o ventre materno para ter acesso ao seu mamilo (Alberts, 2008; Sullivan, 2017). O odor materno regula as interações mãe-filhote no início da vida, quando a aprendizagem de apego é totalmente favorecida e a aprendizagem aversiva é atenuada para evitar que os filhotes aprendam a evitar a mãe ou cuidador (Debiec & Sullivan, 2017; Perry et al., 2016; Rainecki et al., 2010).

Em nosso primeiro estudo (artigo 1) observamos variações no comportamento maternal em relação aos filhotes a partir do dia pós-natal 6. Especificamente a partir desse período a postura de amamentação com o dorso elevado (*high crouch*), e a frequência do comportamento de lambe os filhotes (*licking*) começaram a diminuir gradualmente conforme o período pós-parto progrediu. Também observamos que a partir do dia 6 pós-natal aumentou a frequência com que as mães se ausentam do ninho, principalmente durante o período escuro. O repertório comportamental apresentado pelas mães na primeira semana de vida pós-natal foi rítmico e a maioria das posturas de amamentação observadas foram na primeira sessão de registro diário às 9h e ao longo do dia esses comportamentos diminuíram gradualmente até o último registro às 18h, já no período escuro. A partir desse momento as mães passaram a apresentar comportamentos de deixar o ninho para explorar a caixa moradia (artigo 1). Este intenso cuidado materno fornecido pelas mães nos primeiros dias de vida é considerado um fator crítico para o desenvolvimento adequado dos mamíferos, e alterações nessas interações podem modificar a fisiologia e o comportamento da prole a longo prazo (Meaney, 2001).

Durante o período de lactação, as mães apresentam comportamento de cuidar dos filhotes e esses comportamentos são manifestados através da busca dos mesmos quando estes se afastam do ninho, pela estimulação da micção por meio da lambida anogenital, pelo posicionamento sobre os filhotes para provê-los de nutrição

e calor, pela construção do ninho e por defesa contra intrusos (Albert & Walsh, 1995; Lee et al., 1969).

O trabalho de Maccari et al (1995) mostrou que as mães que passaram pelo procedimento de adoção permaneceram mais tempo lambendo e, apresentaram uma menor latência para o recolhimento dos filhotes do que as mães biológicas. No presente estudo, as mães adotivas apresentaram uma maior latência para o recolhimento dos filhotes do que as mães biológicas. O procedimento de remover a mãe de seu ninho, substituir seus filhotes por filhotes de outra ninhada e espalha-los pelo chão da caixa moradia, provavelmente criou um ambiente de estresse significativo tanto para a mãe quanto para a prole, e, como consequência reduziu a oportunidade para que ocorresse a interação mãe-filhote (Hofer, 1984).

Outro grupo, verificou que mães adotivas apresentaram maior frequência de comportamento exploratório e maior pontuação no teste de construção de ninho do que as mães biológicas (Lerch et al., 2014). Da mesma forma, Barbazanges et al (1996) mostraram que o procedimento de adoção, quando realizado nas primeiras 3-6 horas de vida dos filhotes, aumentou o comportamento de lamber da mãe, mas quando realizado nos dias pós-natal 5 ou 12 não alterou o perfil do comportamento materno, revelando que houve um período em que as mães foram mais sensíveis à separação de seus filhotes.

Luchetti et al (2015) e D'Amato et al (2011), mostraram que o protocolo de adoção cruzada repetida por si só não alterou a frequência de lamber, *grooming* ou qualquer variação do cuidado maternal. Porém, é importante salientar que no protocolo de D'Amato e Luchetti, os filhotes eram colocados dentro do ninho e imediatamente cobertos com a maravalha do ninho adotivo. Em nosso procedimento, os filhotes eram espalhados pela caixa moradia da mãe adotiva e não eram cobertos com maravalha da mãe adotiva ou do ninho adotivo, possivelmente o odor dos filhotes adotivos tenha sido um fator importante para induzir rapidamente qualquer comportamento materno em relação aos filhotes.

Ainda assim, há uma inconsistência nos dados entre os diversos trabalhos disponíveis na literatura e esse fato pode ser devido a diferentes versões do protocolo de RCF, diferentes formas de registrar o comportamento maternal ou às diferentes cepas utilizadas por esses grupos de pesquisa.

Consistente com a ideia de que o procedimento de RCF é uma situação estressante para a mãe, encontramos um aumento no escore no comportamento de



autolimpeza durante e após os dias do procedimento do RCF. Tem sido proposto que a autolimpeza é um comportamento adaptativo importante que os ratos exibem em situações estressantes para reduzir a ansiedade e que as ratas lactantes exibem o comportamento de autolimpeza aumentado quando elas são expostas a ambientes estressantes (Nephew & Bridges, 2011). Isso sugere que o protocolo RCF em nosso estudo foi um importante estressor para as mães, pois vimos que elas realizaram mais comportamentos de autolimpeza e também passaram mais tempo explorando a gaiola e conseqüentemente menos tempo cuidando dos filhotes.

## 4.2 EFEITOS DO RCF PRECOCE SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS FILHOTES

### 4.2.1 Preferência olfatória para o odor materno

Nosso estudo mostrou que a troca repetida de fêmeas cuidadoras lactantes durante o período inicial do pós-parto, afetou a preferência olfatória dos filhotes de ratos com 7 dias de vida para a mãe adotiva (última fêmea lactante) e também para a mãe biológica. Vale ressaltar que o estímulo das mães biológicas (maravalha no estado gestacional) foi utilizado para avaliar o comportamento da prole em resposta aos estímulos dessa mesma mãe após os filhotes terem sido submetido ao protocolo de RCF. Esperávamos que as crias pudessem expressar a memória de sua mãe biológica. Entretanto, os resultados não confirmaram nossa hipótese, uma vez que os filhotes com 7 dias de vida pós-natal não mostraram preferência pela maravalha de sua mãe biológica. Considerando que o cecótopo aumenta após o parto Leon (1975), é possível que a quantidade de odor materno nos estímulos utilizados tenha sido baixa. Outra possível razão para a ausência de preferência poderia ser a redução de moléculas odoríferas durante o tempo de conservação do material usado como estímulo (maravalha e fezes).

O apego do filhote à mãe pode ser operacionalmente definido como os comportamentos de orientação e aproximação que o filhote exhibe para o cheiro da mãe e para odores associados a ela. Esse comportamento é expresso e pode ser medido pelas respostas de preferência olfatória do filhote ao odor da mãe em testes

de duas escolhas, conforme apresentado neste trabalho. Essa preferência inicial do filhote é formada durante as interações com a mãe no ninho por meio de processos associativos de aprendizagem e ocorre em uma janela temporal para sua formação, denominada período sensível ao apego (Debiec & Sullivan, 2017; Opendak et al., 2017), o qual, corresponde aos primeiros 10 dias de vida de um rato. Os dados do nosso primeiro estudo, mostraram que os filhotes de todas as faixas etárias estudadas (3, 7, 11 e 15 DPN) apresentaram respostas de preferência olfatória ao odor materno e essa preferência aumentou conforme o desenvolvimento pós-natal avançava, de forma semelhante em filhotes machos e fêmeas. No DPN 3 os filhotes já discriminaram o odor materno, porém foi a partir do dia 7 DPN que as respostas de busca e aproximação se tornaram significativamente mais consistentes (artigo 1). Um padrão de respostas semelhante foi descrito no trabalho de Meyer e Alberts (2016), no qual filhotes de camundongos (*Mus musculus*) com 5, 10 e 12 DPN apresentaram respostas de orientação e preferência para o odor do próprio ninho em relação ao odor de maravalha limpa e essa preferência também aumentou durante o desenvolvimento pós-natal.

Além disso, nossos dados também indicaram que os filhotes adotados precocemente tiveram dificuldades em buscar e se aproximar do mamilo da mãe adotiva e da mãe biológica para a lactação. Provavelmente a instabilidade do ambiente pós-natal induzida pelo protocolo do RCF afetou essa capacidade. Para garantir a sobrevivência os filhotes de ratos exibem comportamentos de busca e aproximação persistentes em direção ao ventre materno, ligam-se ao mamilo e sugam o leite materno. Esses comportamentos que os filhotes direcionam a mãe além de serem importantes para a sobrevivência dos filhotes eles também são sinais importantes e necessários para receber o cuidado maternal (Alberts, 2008; Sullivan, 2017).

Os trabalhos do grupo da professora Regina Sullivan mostraram de maneira consistente que o vínculo (apego) filhote-mãe se dá por um processo de aprendizado e formação de memória desta relação filial inicial (Sullivan & Wilson, 1991; Landers & Sullivan, 2012; Opendak & Sullivan, 2016). Tanto em humanos como em animais, o apego requer uma breve experiência de aprendizado das características sensoriais da figura materna (odor, textura, cor, som), que se produz durante as primeiras interações do neonato com seu cuidador (Debiec & Sullivan, 2017; Rainecki et al., 2010; Sullivan & Holman, 2010). Neste período, também chamado de período sensível

ao apego, os filhotes podem ser facilmente condicionados a outro odor que não seja o materno, desde que seja pareado com estímulos táteis (Debiec & Sullivan, 2017; Landers & Sullivan, 2012; Meyer & Alberts, 2016) indicando um processo de aprendizado associativo.

As alterações que encontramos no desenvolvimento das respostas de preferência olfatória em filhotes de ratos com 7 DPN sugerem que a adoção precoce provavelmente interrompeu o processo de aprendizagem associativa necessário para estabelecer a ligação entre a mãe adotiva e os filhotes em desenvolvimento (Landers & Sullivan, 2012; Luchetti et al., 2015). Os animais que passaram pelo processo de adoção precoce apresentaram dificuldade em reconhecer e preferir o odor da mãe biológica e também da mãe adotiva, o que indica que uma interferência ambiental, como a adoção, nesse período, teve consequências importantes na relação mãe-filhote.

Neste estudo, os filhotes adotados foram expostos a estímulos maternos de 4 mães diferentes, condição que pode ter interferido negativamente na aprendizagem do odor materno e consequentemente na formação do apego mãe-filhote no DPN 7. Tudo indica que o pareamento que deveria ocorrer dentro do ninho foi prejudicado pela diminuição dos comportamentos maternos diários e, consequentemente os filhotes apresentaram menos respostas de busca e aproximação pelo odor materno, e maior latência para as respostas de ligação ao mamilo. O aprendizado de preferência olfatória é fortemente dependente dos repertórios comportamentais que a mãe direciona para o filhote, e da responsividade do sistema nervoso do filhote para com os estímulos táteis maternos (Sullivan, 2017).

Provavelmente, as alterações no ambiente neonatal precoce, provocadas pelas trocas repetidas de fêmeas lactantes, impactaram a formação do apego mãe-filhote. É importante salientar que nos dias 2 e 3 pós-natal, as cuidadoras lactantes apresentaram uma mudança significativa no comportamento direcionado aos filhotes, o qual, foi restabelecido imediatamente após o término da intervenção.

#### **4.2.2 Preferência Olfatória / evitação para o odor de predador**

Também analisamos o efeito da troca repetida de cuidadores lactantes no sistema de inibição de preferência olfativa por meio de respostas de aproximação e / ou evitação de um estímulo naturalmente aversivo no dia 7 pós-natal. Observamos

que a adoção precoce não alterou as respostas aversivas, pois os filhotes adotados com 7 DPN não apresentaram comportamento diferentes para o odor de predador quando comparado com os filhotes controles. É importante notar que nenhum dos animais testados tinha experiência com esse tipo de odor.

A atenuação do medo e da evitação foram sugeridas como características extremamente importantes do processo de apego, pois aprender a temer ou a evitar a fonte de alimento e proteção (mãe) não seria ideal para a sobrevivência dos filhotes. Assim Hofer & Sullivan, 2008 sugerem que é melhor formar um repertório de comportamentos de busca e de aproximação da mãe, independente da qualidade dos cuidados recebidos. Esta atenuação da aprendizagem aversiva e da evitação foi demonstrada em filhotes de ratos durante o período sensível para a aprendizagem de apego. Especificamente, o condicionamento de um novo odor com um estímulo doloroso, tal como choque de 0,5mA na cauda ou na pata traseira, mostrou que os filhotes que foram submetidos a este paradigma se aproximam do odor condicionado quando este é reapresentado (Camp & Rudy, 1988; Sullivan et al., 1986).

No primeiro estudo dessa tese fizemos uma caracterização das respostas de aproximação e evitação de filhotes de rato com diferentes idades pós-natal para o odor de predador (odor de urina gato) e observamos que filhotes com 3 e 7 dias de vida pós-natal não apresentaram respostas de evitação para o odor de urina de gato (artigo 1). A incapacidade dos filhotes de ratos em apresentarem comportamentos de medo e evitação em resposta a combinação dor – odor durante o período sensível ao apego pode ser devido ao fato de que o filhote de rato naturalmente experimenta um pouco de dor provocado pela sua mãe, por exemplo, quando a mãe deixa o ninho para cuidar de suas necessidades ela pode arrastar os filhotes ainda ligados aos seus mamilos ou então ela pode carregá-los pelo pescoço e machucá-los. Por isso aprender uma aversão a odores maternos associados a estas possíveis manipulações ásperas prejudicaria as respostas de procura dos filhotes por calor, nutrição, segurança e consequentemente a sobrevivência (Hofer & Shair, 1978).

#### **4.3 Efeitos do RCF tardio sobre o cuidado materno**

A adoção tardia alterou o comportamento materno em relação aos filhotes mais velhos. Especificamente os cuidados maternos que as mães adotivas direcionaram aos filhotes adotivos diminuiu significativamente no dia 9 pós-natal em

relação as mães controles. Além disso, identificamos algumas características interessantes no comportamento maternal dessas fêmeas lactantes cuidadoras, como um aumento da postura *high crouch* e *high crouch* e *licking* e uma redução da postura supina durante o protocolo de RCF e aumento da postura *high crouch* após o término do procedimento de RCF. Até aproximadamente o dia 12 de vida pós-natal é a mãe quem toma a iniciativa de se aproximar dos filhotes. Sendo assim, a variação no cuidado maternal pode ser considerada o diferencial para as experiências sensoriais no desenvolvimento dos filhotes. Após esse período, os filhotes estão aptos a se locomover e a deixar o ninho, a partir de então passa a serem eles que se aproximam da mãe para requerer cuidados (Grotta & Ader, 1974).

Os padrões de comportamento de apego mãe-filhote são dinâmicos, na qual a mãe contribui com padrões e níveis específicos de cuidado maternal, os quais variam conforme o filhote se desenvolve, enquanto que aparecem novos repertórios comportamentais nos filhotes através da interação mãe-filhote. A alteração dos padrões ou níveis específicos de cuidado materno impactam o desenvolvimento emocional e cognitivo do infante (Sullivan et al., 2011).

A intensidade e a frequência do cuidado materno variam principalmente com o avanço dos dias pós-parto, com o período do dia e com o número de filhotes na ninhada (Champagne et al., 2003; Cramer & Alberts, 1990). A observação pontual a cada 3 minutos durante 72 minutos em 4 períodos do dia (3 no ciclo claro e 1 no ciclo escuro) mostrou que conforme o período pós-parto avança as mães permaneceram menos tempo dentro do ninho cuidando dos filhotes, principalmente no período escuro e, curiosamente no DPN 10 as mães incrementaram a frequência de saída do ninho tanto nos período claro como no escuro (artigo 1).

Durante o tempo que os filhotes permanecem dentro do ninho, exclusivamente sob os cuidados maternos, a única variação ambiental que ocorre é o comportamento da própria mãe. Conforme o filhote se desenvolve a mãe apresenta naturalmente mudanças dinâmicas adequadas ao período de desenvolvimento do filhote. Assim, se o comportamento materno refletiu as interações dinâmicas entre uma fêmea cuidadora e sua prole (Rilling & Young, 2014), no momento em que a adoção cruzada repetida ocorreu, é possível que as características dos filhotes adotados alteraram o comportamento da mãe adotiva ou que o ambiente materno tenha tido um impacto considerável na prole (Yamamuro, 2008).

Nossos dados sugerem que o procedimento de adoção tardia é uma situação estressante para as mães, pois observamos um aumento no escore no comportamento de autolimpeza, o qual foi caracterizado como um comportamento relacionado à ansiedade em uma variedade de espécies (Spruijt et al., 1992). Tem sido sugerido que esse comportamento de autolimpeza é um comportamento ideal para estudar o desenvolvimento de transtornos depressivos e ansiosos e além disso, avaliar potenciais tratamentos para esses transtornos (Kalueff et al., 2007). Após o término do protocolo de RCF tardio, observamos um ligeiro aumento no comportamento de autolimpeza, porém, sem significância. Dessa forma, concluímos que o protocolo de adoção tardia foi um importante estressor para as mães, no entanto, depois que as mães permaneceram com os filhotes, sem interferências, esse comportamento tendeu a diminuir.

#### 4.4 EFEITOS DO RCF TARDIO SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS FILHOTES

##### 4.4.1 Preferência olfatória para o odor materno

O procedimento de adoção tardia realizado durante o período de transição do sensível para o pós-sensível ao apego não interferiu nas respostas de busca e aproximação dos filhotes ao odor da última mãe adotiva. Porém os filhotes adotados tardiamente não mostraram comportamentos de preferência para o odor da mãe biológica (odor da mãe biológica na condição de gestante). Nossa expectativa era de que os filhotes pudessem expressar a memória de sua mãe biológica. Entretanto, os resultados não confirmaram nossa hipótese. Conforme explicado anteriormente, é possível que a quantidade de odor materno nos estímulos utilizados (maravalha e fezes) tenha sido baixa. É importante ressaltar que as últimas fêmeas lactantes cuidadoras estiveram com a prole adotada no período de 12 a 15 DPN e as mães biológicas permaneceram com as ninhadas antes do protocolo de RCF, o qual correspondeu ao no período de 1 a 9 DPN. No primeiro estudo (artigo 1) evidenciamos que as respostas de preferência olfatória para o odor materno foram evidentes a partir do dia 7 DPN e, aumentaram conforme a idade dos filhotes avançou, sendo que no dia 15 DPN a resposta de preferência olfatória para o odor da mãe ainda foi alta e se manteve estável.

Vale ressaltar que o odor materno possui controle especial sobre os filhotes no período de 10 a 15 dias pós-natal, momento em que os filhotes estão atravessando o período de transição do período sensível para o pós-sensível a aprendizagem do apego. Nesse período os estímulos maternos têm a capacidade única de prevenir a aprendizagem aversiva dos filhotes a ameaças através da supressão da atividade da amígdala mediada pela presença da mãe no ninho (Debiec & Sullivan, 2017; Opendak & Sullivan, 2016; Sullivan & Holman, 2010; Upton & Sullivan, 2010).

Nossos dados forneceram evidências de que as adoções realizadas no período sensível e no período de transição para o pós-sensível, tiveram diferentes efeitos comportamentais na prole. Portanto, não é inusitado que nossos resultados tenham mostrado uma forte preferência olfativa pelo odor da mãe adotiva na prole que foi submetida ao protocolo de RCF ou pela mãe biológica nos filhotes controles no dia 15 DPN (período pós-sensível a aprendizagem de apego).

Os filhotes que foram adotados tardiamente também procuraram o mamilo tanto da mãe adotiva quanto da mãe biológica no PND 16 para mamar. Consequentemente o ganho de peso corporal dos filhotes adotados foi semelhante ao dos filhotes que permaneceram com suas mães biológicas e que nunca passaram por nenhuma intervenção ambiental. O odor orienta os comportamentos de aproximação e evitação que começam no nascimento em muitos mamíferos (Al Aïn et al., 2017; Moriceau, 2004). As pistas olfativas são essenciais para roedores recém-nascidos se aproximarem da mãe, se fixarem aos mamilos e suprimirem as vocalizações ultrassônicas na presença de um predador (Perry et al., 2016; Takahashi, 1992).

#### **4.4.2 Preferência Olfatória / evitação para o odor de predador**

Este estudo também analisou o efeito do RCF durante o período de transição para o período pós-sensível ao apego sobre o sistema de inibição de preferência olfatórias por meio de respostas de aproximação e/ou evitação de estímulos considerados naturalmente aversivo no dia pós-natal 15. Os resultados mostraram que os filhotes que passaram pelo protocolo de RCF tardio, não apresentaram respostas de esquiva significativas para o odor aversivo no dia pós-natal 15, indicando que a adoção tardia alterou a capacidade de evitação a um odor biologicamente aversivo nessa idade, o que pode ser extremamente ariscado para os animais que estão começando a se aventurar fora do ninho.

Na caracterização que fizemos das respostas de aproximação e evitação de filhotes de rato com diferentes idades pós-natal para o odor de predador (odor de urina gato), no primeiro estudo dessa tese (artigo 1), observamos que filhotes com 11 dias de vida pós-natal apresentaram respostas consistentes de evitação ao odor de predador e essas respostas aumentaram conforme a idade pós-natal avança, de forma semelhante em machos e fêmeas.

Em filhotes de ratos, o odor de um rato macho adulto é um odor aversivo, inferido pelo fato de interromper as vocalizações ultrassônicas durante os primeiros dias de vida e causar imobilidade / congelamento em filhotes mais velhos no dia 10 pós-natal (Moriceau et al., 2004; Perry et al., 2016; Takahashi, 1992). Além disso, próximo ao dia pós-natal 10, os filhotes de ratos começam a se aventurar fora do ninho (Bolles & Woods, 1964). Com a finalidade de reduzir a aprendizagem de apego e permitir que o filhote comece a aprender a evitar os estímulos aversivos, os níveis de corticosterona aumentam gradualmente, embora um nível crítico seja alcançado naturalmente somente a partir do dia 10 pós-natal (Moriceau et al., 2004) quando a amígdala se integra funcionalmente para suportar respostas defensivas inatas específicas da espécie ao odor de predador, como o congelamento (Moriceau & Sullivan, 2004; Sullivan et al., 2000; Wiedenmayer & Barr, 2001). Isso coincide com o término do período sensível ao apego e com a maturação neurobiológica do filhote (Debiec & Sullivan, 2017; Moriceau et al., 2010; Opendak & Sullivan, 2016).

#### 4.5 RELAÇÃO COM ESTUDOS EM HUMANOS

Esta tese apontou, do ponto de vista experimental, que a instabilidade do ambiente neonatal causado pelas trocas sucessivas de mães adotivas induziu alterações significativas na formação do vínculo (apego) mãe-filhote, dependendo da fase do desenvolvimento em que ocorreu a adoção. Estes resultados são importantes pois podem auxiliar a compreender, de forma indireta, os efeitos da adoção de crianças em diferentes idades após o nascimento sobre o apego por seus pais adotivos e a consequente relação entre pais adotivos e filho adotado.

Os bebês humanos se ligam rapidamente a seus cuidadores. Como originalmente sugerido por (Bowlby, 1965), a criança busca proximidade com a mãe ou com outro cuidador permanente para ter uma sensação de segurança. O apego é



um vínculo forte que pode ser formado em qualquer estágio do desenvolvimento pós-natal, tanto em humanos como em outros animais sociais. Cabe ressaltar que o vínculo entre mãe e filho é um dos exemplos mais robustos de apego. Dentro desta dupla mãe-filho, o bebê está aprendendo e memorizando características do cuidador, o que permite que fortes ligações sejam formadas com cuidadores não-biológicos de ambos os sexos. Uma vez que as características principais do cuidador são aprendidas, um apego/vínculo rapidamente se forma e assim, o cuidador assume um papel importante ao influenciar o processamento dos estímulos sensoriais pelo bebê, o que altera o comportamento infantil.

Um aspecto importante, é que as experiências iniciais da criança com a sua mãe ou cuidador fornecem o modelo básico para as relações sócio afetivas na vida adulta (Moriceau et al., 2010; Sullivan et al., 2015). Da mesma forma, muitos trabalhos evidenciam as consequências da instabilidade no ambiente neonatal, entre elas, de ordem física, intelectual e social, podendo inclusive desencadear patologias de ordem físicas e mentais (Oppenheim et al., 2001). Dentro desta perspectiva, a estabilidade do ambiente neonatal, durante o período de formação do apego pela figura materna (cuidador) é crucial para o desenvolvimento saudável da criança e para o estabelecimento seguro do vínculo cuidador-criança ou pais adotivos-filhos adotados. Isso nos deixa um alerta para que sejam intensificadas medidas públicas nas instituições de acolhimento para que o ambiente neonatal seja o mais estável possível, tanto dentro das instituições quanto nos novos lares para onde as crianças adotadas forem encaminhadas.



## **CAPÍTULO V**

### **5 CONCLUSÕES**

1. A adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes cuidadoras realizadas durante o período sensível a aprendizagem do apego mãe-filhote (DPN 1 a 3) afeta a formação do vínculo mãe-filhote e reduz o cuidado materno das fêmeas lactantes em relação aos filhotes recém-nascidos.

2. A adoção cruzada repetida de fêmeas lactantes cuidadoras realizadas durante o período de transição do sensível para o pós-sensível a aprendizagem do apego mãe-filhote (DPN 9 a 11) não altera o vínculo mãe-filhote

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como sempre, a extrapolação direta de pesquisas de qualquer espécie para seres humanos requer cautela. No entanto, o nosso modelo experimental, de adoção repetida de fêmeas lactantes em ratos (*repeated cross-fostering*), se mostrou um bom modelo para mimetizar o complexo fenômeno que é a adoção humana.

Dessa forma, apesar da adoção maternal ainda ser uma área pouco explorada de forma experimental pela neurociência, acreditamos que os resultados dessa tese contribuíram para elucidar os efeitos do rompimento do vínculo mãe-filhote (apego) no início do desenvolvimento pós-natal sobre os comportamentos filiais.

## 7 PERSPECTIVAS

Dando continuidade a este estudo, seria importante investigar, dentro deste modelo de RCF, a participação da corticosterona e da ocitocina periféricas, nos efeitos da adoção sobre a formação do apego. Assim como a expressão de receptores centrais de ocitocina em animais que foram expostos ao modelo de adoção RCF. Para a realização destes novos estudos já foram coletados o plasma e o encéfalo dos animais utilizados no presente estudo.

Além disso, uma outra abordagem interessante seria a realização de estudos epigenéticos em animais que foram expostos ao modelo de adoção RCF.

Tais abordagens poderiam fornecer mais informações sobre os fatores envolvidos na formação e a manutenção do apego mãe-infante, a qual, é importante para o entendimento de como os eventos ambientais no início da vida impactam o desenvolvimento de processos sócio emocionais, cognitivos e na saúde mental do infante.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Aïn, S., Perry, R. E., Nuñez, B., Kayser, K., Hochman, C., Brehman, E., ... Sullivan, R. M. (2017). Neurobehavioral assessment of maternal odor in developing rat pups: implications for social buffering. *Social Neuroscience*, 12(1), 32–49. <https://doi.org/10.1080/17470919.2016.1159605>
- Albert, D. J., & Walsh, M. L. (1995). Aggression in the lactating female rat: the normal decline is not dependent on the physical development of the pups. *Physiology & Behavior*, 58(3), 477–481. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8587955>
- Alberts, J. R. (2008). The Nature of Nurturant Niches in Ontogeny. *Philosophical Psychology*, 21(3), 295–303. <https://doi.org/10.1080/09515080802169814>
- Alberts, J. R., & Brunjes, P. C. (1978). Ontogeny of thermal and olfactory determinants of huddling in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(5), 897–906. <https://doi.org/10.1037/h0077533>
- Alberts, J. R., & May, B. (1984). Nonnutritive, thermotactile induction of filial huddling in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 17(2), 161–181. <https://doi.org/10.1002/dev.420170207>
- Askeland, K. G., Hysing, M., Aarø, L. E., Tell, G. S., & Sivertsen, B. (2015). Mental health problems and resilience in international adoptees: Results from a population-based study of Norwegian adolescents aged 16–19 years. *Journal of Adolescence*, 44, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2015.07.001>
- Askeland, K. G., Hysing, M., La Greca, A. M., Aarø, L. E., Tell, G. S., & Sivertsen, B. (2017). Mental Health in Internationally Adopted Adolescents: A Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 56(3), 203–213.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2016.12.009>
- Barbazanges, A., Vallée, M., Mayo, W., Day, J., Simon, H., Le Moal, M., & Maccari, S. (1996). Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7783–7790. <https://doi.org/https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07783.1996>
- Bolles, R. C., & Woods, P. J. (1964). The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Learning and Behavior*, 427–441.
- Bowlby, J. (1958). The nature of the child's tie to his mother. *International Journal of Psychoanalysis*, 39(5), 350–373.
- Bowlby, J. (1965). *Attachment* (Basic Book). New York.
- Bowlby, J. (1982). *Attachment: Attachment and loss* (Basic Book). New York.
- Bruce, J., Tarullo, A. R., & Gunnar, M. R. (2009). Disinhibited social behavior among internationally adopted children. *Development and Psychopathology*, 21(01), 157–171. <https://doi.org/10.1017/S0954579409000108>

- Camp, L. L., & Rudy, J. W. (1988). Changes in the Categorization of Appetitive and Aversive Events During Postnatal Development of the Rat, *21*(June 1986), 25–42.
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology and Behavior*, *79*(3), 359–371. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00149-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00149-5)
- Cittaro, D., Lampis, V., Luchetti, A., Coccarello, R., Guffanti, A., Felsani, A., ... Battaglia, M. (2016). Histone modifications in a mouse model of early adversities and panic disorder: Role for *Asic1* and neurodevelopmental genes. *Scientific Reports*, *6*(December 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep25131>
- Cramer, C. P., & Alberts, J. R. (1990). Weaning in Rats : I . *Maternal Behavior*, *23*(July 1989), 479–493.
- D'Amato, F. R., Zanettini, C., Lampis, V., Coccarello, R., Pascucci, T., Ventura, R., ... Battaglia, M. (2011). Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO2 sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS ONE*, *6*(4), 2–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018637>
- Debiec, J., & Sullivan, R. M. (2017). The neurobiology of safety and threat learning in infancy. *Neurobiology of Learning and Memory*, *143*, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.10.015>
- Delcenserie, A., & Genesee, F. (2014). Language and memory abilities of internationally adopted children from China: evidence for early age effects. *Journal of Child Language*, *41*(06), 1195–1223. <https://doi.org/10.1017/S030500091300041X>
- Dozier, M., & Rutter, M. (2016). Challenges to the development of attachment relationships faced by young children in foster and adoptive care. In *Handbook of attachment. Theory, research, and clinical application* (3rd ed., pp. 269–714). New York: Guilford Press.
- Feldman, R. (2016). The neurobiology of mammalian parenting and the biosocial context of human caregiving. *Hormones and Behavior*, *77*, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.10.001>
- Galef, B. G., & Henderson, P. W. (1972). Mother's milk: A determinant of the feeding preferences of weaning rat pups. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *78*(2), 213–219. <https://doi.org/10.1037/h0032186>
- Grota, L. J., & Ader, R. (1974). Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage\*1. *Hormones and Behavior*, *5*(4), 275–282. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(74\)90014-2](https://doi.org/10.1016/0018-506X(74)90014-2)
- Grota, Lee J., & Ader, R. (1969). Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. *Animal Behaviour*, *17*(4), 722–729. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(69\)80019-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(69)80019-9)
- Grotevant, H. D., & McDermott, J. M. (2014). Adoption: Biological and Social Processes Linked to Adaptation. *Annual Review of Psychology*, *65*(1), 235–265. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010213-115020>
- Hofer, M. A., & Sullivan, R. M. (2008). Toward a neurobiology of attachment. In C. A. Nelson

- & M. Luciana (Eds.), *Handbook of developmental cognitive neuroscience* (pp. 787–806). Cambridge: MIT Press.
- Hofer, M A. (1984). Relationships as regulators: a psychobiologic perspective on bereavement. *Psychosomatic Medicine*, 46(3), 183–197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6739679>
- Hofer, Myron A., & Shair, H. (1978). Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Developmental Psychobiology*, 11(5), 495–504. <https://doi.org/10.1002/dev.420110513>
- Juffer, F., & Van IJzendoorn, M. (2009). International adoption comes of age: Development of international adoptees from a longitudinal and meta-analytic perspective. In *International advances in adoption re- search and practice* (pp. 169–192). Sussex: Wiley-Blackwell.
- Kalueff, A. V, Wheaton, M., & Murphy, D. L. (2007). What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, 179(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.01.023>
- Keyes, M. A., Malone, S. M., Sharma, A., Iacono, W. G., & McGue, M. (2013). Risk of Suicide Attempt in Adopted and Nonadopted Offspring. *PEDIATRICS*, 132(4), 639–646. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-3251>
- Klaus, M. H., Kennell, J. H., & Klaus, P. H. (2000). *Vínculo: construindo as bases para um apego seguro e para a independência*. (Artes Médi). Porto Alegre.
- Kojima, S., & Alberts, J. R. (2009). Maternal care can rapidly induce an odor-guided huddling preference in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 51(1), 95–105. <https://doi.org/10.1002/dev.20349>
- Landers, M. S., & Sullivan, R. M. (2012). The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Developmental Neuroscience*, 34(2–3), 101–114. <https://doi.org/10.1159/000336732>
- Lebovici, S. (1987). *O bebê, a mãe e o psicanalista*. (Artes Médi). Porto Alegre.
- Lenzi, D., Trentini, C., Tambelli, R., & Pantano, P. (2015). Neural basis of attachment-caregiving systems interaction: insights from neuroimaging studies. *Frontiers in Psychology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01241>
- Leon, M. (1975). Dietary control of maternal pheromone in the lactating rat. *Physiology & Behavior*, 14(3), 311–319. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(75\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90039-6)
- Lerch, S., Brandwein, C., Dormann, C., Gass, P., & Chourbaji, S. (2014). What makes a good mother? Implication of inter-, and intrastrain strain “cross fostering” for emotional changes in mouse offspring. *Behav Brain Res*, 274, 270–281.
- Luchetti, A., Oddi, D., Lampis, V., Centofante, E., Felsani, A., Battaglia, M., & D’Amato, F. R. (2015). Early handling and repeated cross-fostering have opposite effect on mouse emotionality. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(4), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00093>
- Lucion, A. B., & Bortolini, M. C. (2014). Mother-pup interactions: rodents and humans. *Frontiers in Endocrinology*, 5(7), 17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00017>



- Maccari, S., Piazza, P. V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., & Le Moal, M. (1995). Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1), 110–116. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823121>
- Mainardi, D., Marsan, M., & Pasquali, A. (1965). Causation of sexual preferences of the house mouse. The behaviour of mice reared by parents whose odour was artificially altered. *Subject Strain Bibliography*, 104, 325–338.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal Care, Gene Expression, and the Transmission of Individual Differences in Stress Reactivity Across Generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1161–1192. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1161>
- Meyer, P. M., & Alberts, J. R. (2016). Non-nutritive, thermotactile cues induce odor preference in infant mice (*Mus musculus*). *Journal of Comparative Psychology*, 130(4), 369–379. <https://doi.org/10.1037/com0000044>
- Moriceau, S., Shionoya, K., Jakubs, K., & Sullivan, R. M. (2009). Early-Life Stress Disrupts Attachment Learning: The Role of Amygdala Corticosterone, Locus Coeruleus Corticotropin Releasing Hormone, and Olfactory Bulb Norepinephrine. *Journal of Neuroscience*, 29(50), 15745–15755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4106-09.2009>
- Moriceau, Stephanie. (2004). Unique Neural Circuitry for Neonatal Olfactory Learning. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1182–1189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4578-03.2004>
- Moriceau, Stephanie, Roth, T. L., Okotoghaide, T., & Sullivan, R. M. (2004). Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups, 22, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.011>
- Moriceau, Stephanie, Roth, T. L., & Sullivan, R. M. (2010). Rodent model of infant attachment learning and stress. *Developmental Psychobiology*, 52(7), 651–660. <https://doi.org/10.1002/dev.20482>
- Moriceau, Stephanie, & Sullivan, R. M. (2004). Corticosterone influences on Mammalian neonatal sensitive-period learning. *Behavioral Neuroscience*, 118(2), 274–281. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.2.274>
- Moriceau, Stephanie, & Sullivan, R. M. (2005). Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology*, 47(3), 230–242. <https://doi.org/10.1002/dev.20093>
- Nephew, B. C., & Bridges, R. S. (2011). Effects of chronic social stress during lactation on maternal behavior and growth in rats. *Stress*, 14(6), 677–684. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.605487>
- Opendak, M., Gould, E., & Sullivan, R. (2017). Early life adversity during the infant sensitive period for attachment: Programming of behavioral neurobiology of threat processing and social behavior. *Accident Analysis and Prevention*. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2017.02.002>
- Opendak, M., & Sullivan, R. M. (2016). Unique neurobiology during the sensitive period for attachment produces distinctive infant trauma processing. *European Journal of Psychotraumatology*, 7(11), 31276. <https://doi.org/10.3402/ejpt.v7.31276>

- Oppenheim, D., Koren-Karie, N., & Sagi, A. (2001). Mothers' empathic understanding of their preschoolers' internal experience: Relations with early attachment. *International Journal of Behavioral Development*, 25(1), 16–26. <https://doi.org/10.1080/01650250042000096>
- Palacios, J., & Brodzinsky, D. (2010). Review: Adoption research: Trends, topics, outcomes. *International Journal of Behavioral Development*, 34(3), 270–284. <https://doi.org/10.1177/0165025410362837>
- Perry, R. E., Al Aïn, S., Raineke, C., Sullivan, R. M., & Wilson, D. a. (2016). Development of Odor Hedonics: Experience-Dependent Ontogeny of Circuits Supporting Maternal and Predator Odor Responses in Rats. *Journal of Neuroscience*, 36(25), 6634–6650. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0632-16.2016>
- Raineke, C., Moriceau, S., & Sullivan, R. M. (2010). Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biological Psychiatry*, 67(12), 1137–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.019>
- Raineke, C., Pickenhagen, A., Roth, T. L., Babstock, D. M., McLean, J. H., Harley, C. W., ... Sullivan, R. M. (2010). The neurobiology of infant maternal odor learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(10), 914–919. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>
- Rilling, J. K., & Young, L. J. (2014). The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science*, 345(6198), 771–776. <https://doi.org/10.1126/science.1252723>
- Spruijt, B. M., van Hooff, J. A., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, 72(3), 825–852. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825>
- Sullivan, R. M. (2003). Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008(3), 122–131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998878>
- Sullivan, R. M., & Holman, J. (2010). Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: the role of corticosterone. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 835–844. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.11.010>
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., Ravel, N., & Mouly, A.-M. (2015). Olfactory memory networks : from emotional learning to social behaviors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(2), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00036>
- Sullivan, R., Perry, R., Sloan, A., Kleinhaus, K., & Burtchen, N. (2011). Infant Bonding and Attachment to the Caregiver: Insights from Basic and Clinical Science. *Clinics in Perinatology*, 38(4), 643–655. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2011.08.011>
- Sullivan, R M, Stackenwalt, G., Nasr, F., Lemon, C., & Wilson, D. A. (2000). Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(5), 957–962. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085610>
- Sullivan, R M, & Wilson, D. A. (1991). The role of norepinephrine in the expression of learned olfactory neurobehavioral responses in infant rats. *Psychobiology (Austin, Tex.)*, 19(4), 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>

- Sullivan, Regina M. (2017). Attachment Figure's Regulation of Infant Brain and Behavior. *Psychodynamic Psychiatry*, 45(4), 475–498. <https://doi.org/10.1521/pdps.2017.45.4.475>
- Sullivan, Regina M., Hofer, M. A., & Brake, S. C. (1986). Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Developmental Psychobiology*, 19(6), 615–623. <https://doi.org/10.1002/dev.420190612>
- Sullivan, Regina M., Wilson, D. A., Wong, R., Correa, A., & Leon, M. (1990). Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. *Developmental Brain Research*, 53(2), 243–247. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90013-O](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90013-O)
- Sullivan, & Wilson. (2003). Molecular Biology Of Early Olfactory Memory. *Learning & Memory*, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.1101/lm.58203>
- Takahashi, L. K. (1992). Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. *Physiology & Behavior*, 52(3), 493–498. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90336-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90336-Z)
- Upton, K. J., & Sullivan, R. M. (2010). Defining age limits of the sensitive period for attachment learning in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 52(5), 453–464. <https://doi.org/10.1002/dev.20448>
- Westermeyer, J., Yoon, G., Amundson, C., Warwick, M., & Kuskowski, M. A. (2015). Personality disorders in adopted versus non-adopted adults. *Psychiatry Research*, 226(2–3), 446–450. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.12.067>
- Westermeyer, J., Yoon, G., Tomaska, J., & Kuskowski, M. A. (2014). PT NU SC Internalizing Disorder in Adopted Versus Non-adopted Adults : *Comprehensive Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2014.05.014>
- Wiedenmayer, C. ., & Barr, G. A. (2001). Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. *Behav Brain Res*, 126, 147–157.
- Yamamuro, Y. (2008). Maternal Environment Alters Social Interactive Traits But Not Open-Field Behavior in Fischer 344 Rats. *Experimental Animals*, 57(5), 439–446. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.439>
- Yoon, G., Westermeyer, J., Warwick, M., & Kuskowski, M. A. (2012). Substance use disorders and adoption: findings from a national sample. *PloS One*, 7(11), e49655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049655>

## ANEXO A

Comprovante de envio do Artigo I “*Development of Behavioral Responses to Biologically Relevant Odors in Infant Rats*” para a revista *Journal Comparative Psychology*.

**De:** Journal of Comparative Psychology em@editorialmanager.com  
**Assunto:** Submission Confirmation for Development of Behavioral Responses to Biologically Relevant Odors in Infant Rats - [EMID:783d18e7b0daca20]  
**Data:** 12 de maio de 2019 23:31  
**Para:** Andrea Dulor Finkler andrea\_finkler@hotmail.com



Dear Mrs Finkler,

Your submission "Development of Behavioral Responses to Biologically Relevant Odors in Infant Rats" has been received by Journal of Comparative Psychology.

You will be able to check on the progress of your submission by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://eur01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Fcom%2F&data=02%7C01%7C%7C8d031c0cc51e4ec74b74b1beb%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636933114917025059&sdata=%2F25F%2FDMN%2BiuXLQG6QZfgm61zfgMiQ%2FCJJo%2BQPXFTJ6A%3D&reserved=0>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.



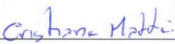
APA asks that you please take a moment to give us your feedback on the submission process, by completing a short survey, available at <https://eur01.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fgoo.gl%2Fforms%2FvKXocF4Jk&data=02%7C01%7C%7C8d031c0cc51e4ec74b74b1beb%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636933114917035076&sdata=08qUFU%2BWXxHr9ol7NJmJX9Kk96QnZ7u9mxln6ch1%2F2M%3D&reserved=0>.

Best regards,

Editorial Office  
Journal of Comparative Psychology

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://eur01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Fcom%2Flogin.asp%3Fa%3Dr&data=02%7C01%7C%7C8d031c0cc51e4ec74b74b1beb%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636933114917035076&sdata=0tLFBpNK16XgQqv%2BRYQPE9N%2FDo7EzPHsr71puy%2BzhcQ%3D&reserved=0>). Please contact the publication office if you have any questions.

## ANEXO B

 <b>UFRGS</b> <small>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL</small>	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> <b>Comissão De Ética No Uso De Animais</b>	
<b>CARTA DE APROVAÇÃO</b>		
<b>Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:</b>		
<b>Número:</b> 28367		
<b>Título:</b> ESTUDO DA TRANSICAO DO PERIODO NEONATAL SENSIVEL AO APEGO PARA O DE DESAPEGO EM FILHOTES DE RATOS		
<b>Pesquisadores:</b>		
<b>Equipe UFRGS:</b>		
ALDO BOLTEN LUCION - coordenador desde 01/03/2015		
Grace Violeta Espinoza Pardo - Aluno de Doutorado desde 01/03/2015		
Andréa Dulor Finkler - Aluno de Doutorado desde 01/03/2015		
 <i>Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 40 ratas fêmeas adultas + 12 ratos machos adultos + 160 filhotes machos + 160 filhotes fêmeas, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.</i>		
Porto Alegre, Segunda-Feira, 27 de Abril de 2015		
 _____ CRISTIANE MATTE Vice Coordenador da comissão de ética		
1		

## ANEXO C

Comprovante de envio do Artigo II “*Repeated Cross-Fostering Affects Maternal Behavior and Olfactory Preferences in Rats Pups*” para a revista *Developmental Psychobiology*.

ScholarOne Manuscripts™

Andrea Finkler ▾ Instructions & Forms Help

Developmental Psychobiology

! Home \* Author # Review

Authoring Dashboard / Submission Confirmation

---

### Submission Confirmation

---

Thank you for your revision

---

Submitted to	Developmental Psychobiology
Manuscript ID	DEV-19-014.R1
Title	Repeated Cross-Fostering Affects Maternal Behavior and Olfactory Preferences in Rat Pups
Authors	Finkler, Andrea Pardo, Grace Lucion, Aldo
Date Submitted	13-May-2019

---

Author Da

## ANEXO D



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 31562

**Título:** EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDOCRINOS DA ADOCAO MATERNAL EM FILHOTES DE RATOS

**Vigência:** 15/08/2016 à 20/12/2017

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ALDO BOLTEN LUCION - coordenador desde 15/08/2016

ILMA SIMONI BRUM DA SILVA - pesquisador desde 15/08/2016

Grace Violeta Espinoza Pardo - Aluno de Doutorado desde 15/08/2016

CLARISSA CARMONA DE AZEVEDO BELLAGAMBA - Aluno de Especialização desde 15/08/2016

Andréa Dulor Finkler - Aluno de Doutorado desde 15/08/2016

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 03/10/2016 - NA SALA 330 DO ANEXO I - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 68 ratas (fêmeas) e 16 ratos Wistar (machos) com 70 dias de idade, originários do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.**

Porto Alegre, Sexta-Feira, 14 de Outubro de 2016

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Vice Coordenador da comissão de ética